
DIEU
ET
MON
DROIT

ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

HERAUSGEGEBEN VON

J. BEHRENS HILDESHEIM · **F. BOAS** MÜNCHEN · **A. RIPPEL** GÖTTINGEN

REDIGIERT VON

J. BEHRENS UND **A. RIPPEL**

ACHTER BAND

MIT 130 TEXTABBILDUNGEN



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1937

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig
Printed in Germany

Inhalt des 8. Bandes.

Erstes Heft.

Abgeschlossen am 17. März 1937.

Zweites Heft.

Abgeschlossen am 5. Juli 1937.

Drittes Heft.

Abgeschlossen am 4. September 1937.

Viertes Heft.

Abgeschlossen am 15. Dezember 1937.

(Aus der mikrobiologisch-chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.)

Über die Wirkung von Molybdän- und Vanadiumdüngungen auf Azotobacter-Zahl und Stickstoffbindung in Erde.

Von

H. Bortels.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. November 1936.)

In der ersten kurzen Mitteilung über die Bedeutung des Molybdäns (*Bortels*, 1930) wurde darauf hingewiesen, daß aus dem Verhalten verschiedener Böden sowie wässeriger Auszüge derselben und Lösungen von deren Asche geschlossen werden müsse, daß *Azotobacter*-Gehalt und Fruchtbarkeit eines Bodens abhängig sind von seinem Molybdängehalt. Auf Grund späterer Feststellungen (*Bortels*, 1933) war auch das Vanadium in den Kreis dieser Betrachtungen mit einzubeziehen. Diese Vermutungen erhielten dann ihre Bestätigung durch die zahlreichen Analysen von *Ter Meulen* (1931, 1932) sowie *Konishi* und *Tsuge* (1933, 1934). *Ter Meulens* Molybdänanalysen verschiedener Böden sollen hier wiedergegeben werden, weil sie im Zusammenhang mit den folgenden Ausführungen von besonderer Bedeutung sind.

Tabelle 1. Mo-Analysen nach Ter Meulen.

Herkunft des Bodens	mg Mo pro kg	Herkunft des Bodens	mg Mo pro kg
Berg in der Schweiz (Schiefer)	0,22	Feld bei Rumpen (Limburg)	0,035
Petersberg a. Rh. (Basalt) . .	0,19	Tannenwald b. Rumpen (Sand)	0,01
Wald bei Maria Laach (Tuffstein)	0,15	Sand bei Rumpen (ohne Vegetation)	0,005
Gartenerde aus Delft (sehr fruchtbar	0,13	Wanderdünen	0,001
Feld bei Soest (Utrecht) . .	0,10	Flußsand	0,0005
		Marne bei Limburg	0

Hieraus geht hervor, daß gewöhnliche Ackererde schon einen gewissen Molybdänmangel gegenüber einigen Urgesteinen aufweisen kann. Die von manchen Praktikern empfohlene zusätzliche Düngung mit Gesteinsmehl würde in diesen Zahlen eine wissenschaftliche Begründung finden. Über die Häufigkeit des Vanadiums in Eruptiv- und Sedimentgesteinen unterrichten ferner *Hevesy*, *Alexander* und *Wüstlin* (1930) sowie *Jost* (1932). Stark angereichert sind Molybdän und Vanadium auch in Steinkohlen, Molybdän z. B. im Ruß[1] (*Goldschmidt* und *Peters*, 1933, *Goldschmidt*, 1934). In eigenen Untersuchungen wurde gefunden, daß u. a. geringe Mengen Asche

[1] Wegen der Anreicherung des Molybdäns im Ruß sind *Goldschmidt* und *Peters* der Meinung, daß die von *Ter Meulen* (1931) mit seiner Veraschungsmethode gefundenen Werte im Vergleich zum tatsächlichen Molybdängehalt der analysierten Substanzen zu niedrig liegen.

des in der Landwirtschaft als Düngemittel sehr beliebten Zuckerrübenschlemmkalks das für die Stickstoffbindung durch *Azotobacter* notwendige Molybdän oder Vanadium völlig ersetzen können. Der Schlemmkalk muß also Molybdän und vielleicht auch Vanadium enthalten. Für gegebenenfalls in größerem Umfange notwendig werdende Düngungen mit diesen Elementen würden sich wahrscheinlich noch viele andere und vielleicht auch geeignetere Rohstoffe auffinden lassen.

Eine praktisch wichtige Schlußfolgerung aus diesen Analysen und den Beobachtungen über *Azotobacter* ist zunächst die, daß sich die *Azotobacter*-Zellen eines Bodens nach Zugabe von Wasser, den Nährsalzen Dikaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Calciumcarbonat und Eisensulfat und einer Kohlenstoffquelle nur dann kräftig vermehren können, wenn entweder der Boden oder die zugefügte Nährlösung genügende Mengen Molybdän oder Vanadium enthalten. Diese Erfahrung hat inzwischen *van Niel* (1935) mit einem amerikanischen Boden machen müssen, der sich bei Verimpfung in molybdänfreie Nährlösung so verhielt, als enthielte er überhaupt keinen *Azotobacter*. Wurde der Nährlösung aber Molybdänsalz zugefügt, dann ließ sich *Azotobacter* auch aus diesem Boden sehr gut anreichern. Mit der *Winogradsky*schen Erdplattenmethode (*Keller*, 1934) sowie mittels chemischer Analyse konnte der Molybdanmangel in dieser Erde ebenfalls nachgewiesen werden[1].

Damit ist allgemein die Möglichkeit gegeben, die bislang unerklärliche Beobachtung, daß manche Böden von neutraler Reaktion und mit ausreichendem Vorrat an Phosphor, Kalium und Calcium scheinbar keinen *Azotobacter* enthalten (*Stapp* und *Ruschmann*, 1924), auf Molybdanmangel zurückzuführen. Früher (*Bortels*, 1930) wurde bereits auf diese Möglichkeit hingewiesen und auch betont, daß künftig bei Anwendung der *Azotobacter*-Methode zur Bestimmung des Nährstoffbedarfs eines Bodens Molybdän unbedingt Berücksichtigung finden muß, was jetzt natürlich ebenso für Vanadium und in gewisser Hinsicht auch für Wolfram gilt.

Immerhin könnte nach den Versuchsergebnissen *van Niels* noch der Einwand erhoben werden, daß es sich bei dem von diesem Autor untersuchten sehr sandigen Boden um einen Sonderfall handelt. Diese Annahme trifft jedoch nicht zu. Es scheint vielmehr, als seien Molydan- und Vanadiummangel in unseren Kulturböden weiter verbreitet als allgemein angenommen wird. Denn Molybdan und Vanadium gehören zu den Elementen, die in unserer intensiv betriebenen Landwirtschaft

[1] Die Möglichkeiten, die *Wenzl* (1934) zu scheinbar anderen Ergebnissen und anderen Anschauungen über die Bedeutung des Molybdans führen konnten, wurden bereits von *van Niel* (1935) erläutert. Hier sei nur noch hinzugefügt, daß allein schon die Berücksichtigung des Vanadiums und Wolframs neben Molybdan zur Klärung der scheinbaren Widersprüche genügt (*Bortels*, 1936). Denn wenn auch der Molybdängehalt der von *Wenzl* zur Impfung benutzten kleinen Mengen fruchtbaren Bodens zur Schaffung optimaler Kulturbedingungen vielleicht nicht ausreicht, so doch wahrscheinlich der Gehalt an Vanadium und Wolfram neben Molybdän.

bei der Düngung bisher vollstandig vernachlassigt worden sind (*Bortels*, 1934). Diese Anschauung wird durch die folgenden Versuche gestutzt, die an lehmig-sandigen Ackerböden des Versuchsfeldes der Biologischen Reichsanstalt und an einer vornehmlich aus Erde dieses Feldes sowie Laub und Unkrautern hergestellten Komposterde in Berlin-Dahlem ausgeführt wurden.

Zu 100 ccm eines von 10 g dieser Komposterde mit 200 ccm Leitungswasser kalt gewonnenen Auszuges wurden zugegeben 2 g Mannit, 0,1 g K_2HPO_4, 0,1 g $CaCO_3$ und 0,05 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$. Die Halfte dieser Nahrlosung erhielt einen Zusatz von 0,0005 % Na_2MoO_4. Jeweils 25 ccm dieser beiden Losungen wurden in 300 ccm fassenden *Erlenmeyer*-Kolben im Februar 1930 6 Tage lang bei 29° C aufbewahrt. Dann wurden die mit *Azotobacter*-Rohkultur bewachsenen Losungen mit Salzsaure gekocht und in gleich großen Rohrchen sedimentiert[1].



Abb 1 Beschreibung im Text

In Abb 1 ist deutlich zu erkennen, daß nur in der Nahrlosung mit Molybdat eine starke *Azotobacter*-Entwicklung stattgefunden hat[2]. Die Komposterde zeigte also deutlichen Molybdanmangel. Denn allgemein genugen 5 g eines wirklich fruchtbaren Bodens, um in 100 ccm Nahrlosung starkstes *Azotobacter*-Wachstum hervorzurufen, das durch Zusatz von Molybdansalz nicht weiter gesteigert werden kann. Außerdem beweisen spater noch zu erwahnende Versuche ebenfalls, daß der Molybdangehalt der hier untersuchten Komposterde fur *Azotobacter* unzureichend ist.

Eine gute Schnellmethode zur Beantwortung der Frage, ob ein Boden molybdanbedurftig ist oder nicht, scheint die Erdplattenmethode von *Winogradsky* zu sein (*Keller*, 1934), worauf *van Niel* schon hingewiesen hat. Sie ist einfach, billig und zuverlassig und kam deshalb auch hier zur Anwendung (Tabelle II und III).

Je 50 g Erde des hiesigen Versuchsfeldes mit 2,5 g loslicher Starke, 0,5 g $CaCO_3$, 0,01 g K_2HPO_4, 0,005 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ und Wasser bis etwa 60 % der Kapazitat des Bodens wurden in gewohnliche *Petri*-Schalen von 9 cm Durchmesser eingedruckt; die Oberflache wurde dann mit angefeuchtetem Spatel geglattet.

[1] Genaue Beschreibung des Verfahrens bei *Bortels* (1936). — [2] Die dunkel gefarbten Teile der Sedimente sind ausgefallte Huminsauren.

Tabelle II. **Azotobacter auf Erdplatten mit Erde von einer Fläche mit Leguminosendaueranbau**[1].
4. bis 7. Mai 1935.

Boden	mm Durchmesser					
	der einzelnen Kolonien					im Mittel
Ohne Zusatz	3	5	4	4	7	4,6
+ 0,0005 % Na_2MoO_4	9	10	9	10	12	10,0

Tabelle III. **Azotobacter auf Erdplatten mit Erde von einer Fläche mit geregelter Fruchtfolge.**
7. bis 12. Februar 1936.

Boden	Platten Nr.	mm Durchmesser der einzelnen Kolonien							im Mittel einer Platte	im Mittel aller Platten
Ohne Zusatz	1	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5		
		4,5	4,5	1,0					3,35	
	2	5,0	5,5	3,5	5,0	4,0	7,0	7,0	5,29	4,34
	3	4,0	5,0	6,5	1,5	6,0	3,5	9,0		
		3,0	3,0	3,0	3,0	5,0			4,38	
+ 0,0002 % $NaVO_3$	1	4,0	3,5	4,5	2,5	7,5	7,5	5,5		
		3,5	3,5	4,5	5,0	5,0	6,0	2,5	4,64	
	2	8,0	5,5	6,5	6,0	4,5	4,5		5,83	5,24
	3	Platte zerbrochen								
+ 0,01 % Na_2MoO_4	1	5,0	5,0	5,0	7,0	5,5			5,50	
	2	9,5	7,0	7,0	7,5	8,5	6,0	11,5		
		5,0	5,0	7,5	7,5	11,0	11,5		8,04	7,01
	3	8,0	8,0	6,5	6,0	6,0	6,0	5,0		
		10,0	12,0						7,50	

Es ergibt sich demnach, daß sich die auf der Erde anwachsenden *Azotobacter*-Kolonien kräftiger entwickeln können, wenn dem Boden zu Beginn des Versuchs eine optimale[2] Menge Molybdän- oder Vanadiumsalz zugesetzt wird, sofern der Gehalt der Erde an diesen Elementen ungenügend ist. Aus Tabelle III ist ferner zu entnehmen, daß auch in Erde die fördernde Wirkung des Molybdäns offenbar stärker ist als die des Vanadiums. Bei etwas größerem *Azotobacter*-Gehalt der unter-

[1] Auf der Fläche, die seit 6 Jahren keinen organischen Dünger bekommen hatte, waren seit 3 Jahren nur Leguminosen angebaut worden. — [2] Die Mengen wurden so bemessen, daß auf Grund der an Hand von Nährlösungsversuchen (*Bortels*, 1936) gemachten Erfahrungen und unter Berücksichtigung der Sorptionskraft des Bodens angenommen werden muß, daß die Konzentrationen im Optimalbereich liegen.

suchten Erde ist häufig infolge einer Zugabe von Molybdat oder Vanadat dennoch eine etwas üppigere Entwicklung auf den Platten festzustellen, obwohl hier die Einzelkolonien teilweise oder ganz zu zusammenhängenden Decken miteinander verwachsen. Selbstverständlich müssen die Unterschiede zwischen den Kontrollplatten und den Mo- oder V-Platten am deutlichsten sein, wenn nur wenig *Azotobacter*-Kolonien zur Entwicklung kommen (Tabelle II). Denn eine kleine Anzahl von Kolonien deutet ja darauf hin, daß der Boden nur wenig *Azotobacter* enthält, also auch sein Molybdän- und Vanadiumgehalt höchstwahrscheinlich weit unter dem Optimum liegt, so daß die Zugabe von Molybdat oder Vanadat hier eine größere Wirkung haben muß.

Aus dieser Wirkung des Molybdäns und Vanadiums auf *Azotobacter* in Erde mußte notwendig eine weitere, ebenfalls praktisch wichtige Schlußfolgerung gezogen werden: Es stand zu erwarten, daß der *Azotobacter*-Gehalt eines molybdän- und vanadiumarmen Bodens durch Vanadiumdüngung und noch mehr durch Molybdändüngung erhöht würde. Um dies zu beweisen, wurden einige Böden mit der Erdplattenmethode untersucht unter Verwendung der bereits genannten Nährlösung, und zwar zunächst von den Versuchsfeldflächen mit Leguminosendaueranbau, von denen einige mit Natriummolybdat und Natriumvanadat gedüngt worden waren. Denn auf Grund des Untersuchungsergebnisses in Tabelle II und des Verhaltens der Leguminosen selbst wurde angenommen, daß die Kontrollflächen infolge der mangelhaften Düngung und der fortgesetzten Leguminosenernten eindeutig Molybdänmangel anzeigen würden.

Die Molybdän- und Vanadiumdüngungsversuche auf diesen Böden laufen seit 1932[1]. In dieser Zeit wurden gegeben je qm

1932: 0,25 g Na_2MoO_4, 0,25 g $NaVO_3$;
1933: 0,2 g Na_2MoO_4 (im Frühjahr);
1933: 0,2 g Na_2MoO_4 (im Herbst);
1934: 0,3 g Na_2MoO_4 (nur auf einem Teil der Mo-Flächen);
1935: 0,5 g Na_2MoO_4 (nur auf einem Teil der Mo-Flächen).

Wenn auch, abgesehen von dem ersten abgetrennten Versuch der Tabelle IV, die Anzahl der Kolonien auf der Erde mit Mo-V-Düngung wie ohne Mo-V-Düngung durchschnittlich sehr niedrig liegen, so ist doch eine Wirkung der Molybdän- und Vanadiumdüngungen im Sinne einer Erhöhung der *Azotobacter*-Zahl nicht zu verkennen. Die allgemein niedrigen Werte sind vielleicht mit der Annahme noch anderer, vorläufig unbekannter schädigender Einflüsse, die von dem einseitigen Leguminosendaueranbau und der mangelhaften Düngung ausgehen, zu erklären. Der in Tabelle IV von den anderen Versuchen abgetrennte

[1] Über die Wirkung dieser Düngungen auf die Leguminosen selbst siehe die folgende Mitteilung, S. 13.

Tabelle IV. Azotobacter auf Erdplatten mit Erde von Flächen mit Leguminosendaueranbau.

Datum	Temperatur °C	Zahl der Kolonien	
		auf Kontrollerde	auf Mo—V-Erde
23. bis 28. VI. 1935	26	0 0	sehr groß, nicht zählbar; sehr groß, nicht zählbar
29. IV. bis 2. V. 1935	30	0 0 0	21 27 sehr groß, nicht zählbar
4. bis 7. V. 1935	29	0 0 0 0	3 4 6 8
23. „ 27. I. 1936	25	0 0 2 3	10 9 8 10
31. I. bis 4. II. 1936	25	2 0 0	2 3 2

vom 23. bis 28. Juni 1935 ist insofern anders ausgeführt, als hier die Böden vom 5. bis 23. Juni zunächst mit der vollständigen Nährlösung, aber mit nur 1% Stärke in lockerer Schichtung aufbewahrt wurden. Erst dann wurden sie nach Zugabe von weiteren 5% Stärke und guter Durchmischung in der üblichen Weise festgeknetet. Inzwischen muß wohl auf Kosten der verabreichten Stärke in der mit Molybdat und Vanadat gedüngten Erde eine stärkere Vermehrung der ursprünglich nur ganz spärlich vorhandenen *Azotobacter*-Zellen stattgefunden haben.

Wegen dieses ungewöhnlich geringen *Azotobacter*-Gehaltes auch der mit Molybdat gedüngten Parzellen schien es wünschenswert, die Untersuchungen auf Boden von einer landwirtschaftlich einwandfrei genutzten Fläche auszudehnen. Dazu bot sich Gelegenheit, als 1934 ein seit 2 Jahren nicht mit Stallmist gedüngter, aber sonst gut gepflegter Teil des hiesigen Versuchsfeldes in die Molybdändüngungsversuche zu Leguminosen einbezogen wurde (Tabelle V).

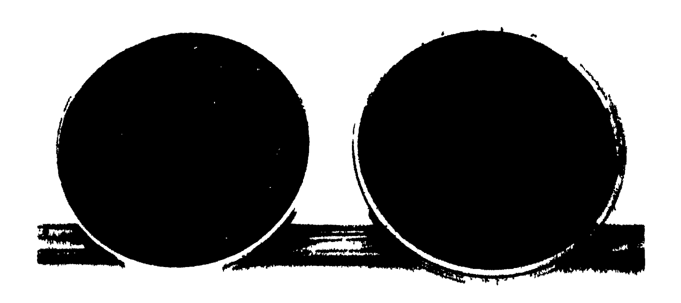
Die Fläche wurde in acht Parzellen zu je 64 qm aufgeteilt, von denen vier eine zusätzliche Düngung von 0,5 g Na_2MoO_4 je qm erhielten, die 1935 wiederholt wurde.

Tabelle V. Azotobacter auf Erdplatten mit Erde von einer Fläche mit geregelter Fruchtfolge. 29° C.

Datum	Parzellenpaar Nr.	Zahl der Kolonien	
		auf Kontrollerde	auf Mo-Erde
21. bis 27. XII. 1934	1	15 30	6/7 bzw. 2/3 der Platte dicht bewachsen
29. XII. 1934 bis 2. I. 1935	1	30 40 30	255 335 420
4. bis 7. I. 1935	1	300 350	655 685
	2	480 430	600 720
	3	150 135	720 615
	4	565 390	615 565

Obwohl dieser Boden noch so unverbraucht ist, daß eine Wirkung der Molybdändüngung auf die hier angebaute Luzerne nicht deutlich in Erscheinung trat, ist die *Azotobacter*-Zahl dennoch erhöht worden. *Azotobacter* ist also offenbar der Organismus, der schon auf geringsten Molybdänmangel im Boden reagiert. Das bestätigen u. a. auch Versuche mit der schon erwähnten Komposterde, die weder als besonders nährstoffreich noch als arm bezeichnet werden kann.

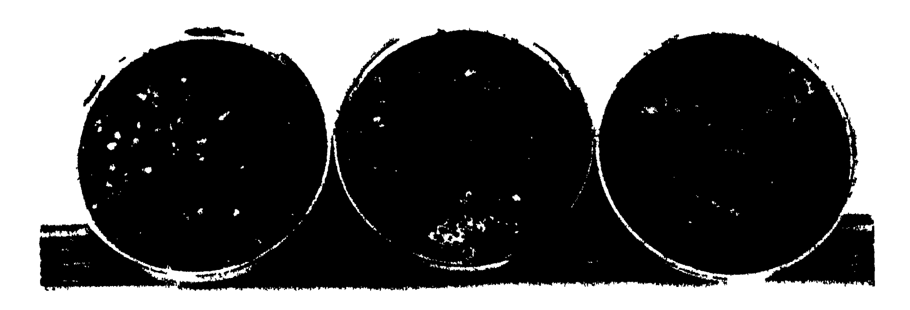
Am 28. Februar 1935 wurde solche 3 Jahre alte Komposterde umgestochen und mit Kalkmergel gemischt. Aus dieser Mischung wurden



Mo Kontr

Abb. 2 Beschreibung im Text.

sechs Haufen angesetzt von 5 m unterer Lange, 1,80 m unterer Breite und 0,90 m Hohe. Zwei dieser Haufen erhielten keine weiteren Zusatze, zwei wurden vor dem Ansetzen mit je 15 g Na_2MoO_4 vermengt und zwei erhielten je eine Mischung von 15 g Na_2MoO_4, 15 mg $NaVO_3$ und 10 g Na_2WO_4.



Kontr. Mo, V, W. Mo.

Abb. 3 Beschreibung im Text.

Dann blieben diese Komposthaufen ohne jede weitere Behandlung bis zum 23. November 1935 stehen. An diesem Tage wurde aus allen Haufen je eine gute Durchschnittsprobe der äußeren 20-cm-Schicht entnommen, die dann alle im Januar und Februar 1936 nach der beschriebenen *Winogradsky*schen Plattenmethode untersucht wurden. Die *Azotobacter*-Zahl erwies sich der

humusreichen Erde entsprechend auf allen Platten als zu groß, um eine Auszählung der Kolonien mit einiger Sicherheit zu ermöglichen. Aus jeder Serie gleicher Düngung eines Versuches, die in ihren Parallelen immer gut übereinstimmte, wurde aber jeweils eine Platte photographiert. Von den Böden ohne Zusatzdüngung und denen mit Molybdän wurden am 23. Januar 1936 Platten angelegt, die bis zum 27. Januar bei 25° C aufbewahrt wurden, während die Böden aller drei Behandlungsarten in gleicher Weise vom 31. Januar bis 4. Februar 1936 untersucht wurden.

An den zur besseren Kenntlichmachung der schleimig glänzenden Kolonien schräg gestellten Platten ist die günstige Wirkung der Molybdändüngung deutlich zu erkennen, während die Düngung mit Molybdat, Vanadat und Wolframat den *Azotobacter*-Gehalt offenbar nicht in dem Umfange erhöht hat wie der Zusatz von Molybdat allein.

Kurz erwähnt werden mag auch noch die Beobachtung, daß die Erdhaufen mit Molybdat einen üppigeren Bestand an Brennesseln trugen als die anderen, die nur mit Kalk gemischt waren. Ob diese Feststellung auf einen höheren Stickstoffgehalt der mit Molybdat behandelten Erde hinweist, muß dahingestellt bleiben, weil entsprechende Analysen an diesem Boden nicht ausgeführt werden konnten. Jedenfalls ist die Möglichkeit durchaus gegeben. Denn, daß eine Molybdändüngung entsprechend der hierdurch bewirkten Erhöhung der *Azotobacter*-Zahl auch die Stickstoffbindung in der Erde fördert, ist anzunehmen.

Jedoch konnte hierfür ein sehr deutlicher Beweis in Laboratoriumsversuchen noch nicht erbracht werden, weil bisher nur Böden des hiesigen Versuchsfeldes analysiert wurden, die offenbar noch so viel Molybdän oder Vanadium und Wolfram enthalten, daß ihre Stickstoffbindung mit Glucose als Energiequelle durch Molybdän- oder Vanadiumdüngung nicht wesentlich gesteigert werden kann (Tabelle VI). Es ist anzunehmen, daß die Wirkung einer Molybdän- oder Vanadiumdüngung auf *Azotobacter*-Gehalt und Stickstoffbindung in Böden, die stärker an diesen Elementen verarmt sind, entsprechend deutlicher sein wird.

Um die Größe der Stickstoffbindung zu ermitteln, wurde in der folgenden Weise verfahren: Der auf 1 mm gesiebte Boden erhielt 1 % Glucose, 0,5 % $CaCO_3$, 0,1 % K_2HPO_4 und 0,05 % $MgSO_4$ und wurde nach Zusatz der Differenzdüngungen und Anfeuchtung bis auf 60 % der Wasserkapazität auf Steinguttellern (*Koch*, 1922) zu je 400 g trockenen Bodens bei 29° C in lockerer Schichtung feucht aufbewahrt. Die Differenzdüngungen bestanden aus 0,01 % Na_2MoO_4 bzw. 0,001 % $NaVO_3$. Bei länger andauernden Versuchen wurde die Glucosegabe wöchentlich wiederholt. Die Stickstoffanalysen wurden nach *Förster* ausgeführt, das Ammoniak jedoch in Borsäure aufgefangen und mit n/50 Schwefelsäure titriert.

Abgesehen von der Förderung der Stickstoffbindung durch Molybdän und Vanadium wäre noch hervorzuheben, daß die Wirkung der Vanadium- und Molybdändüngungen in der weniger sandigen Boden mischung anscheinend etwas größer gewesen ist als in der mehr San

Tabelle VI. Einfluß einer Molybdän- bzw. Vanadiumdüngung auf den Stickstoffgehalt von Felderde im Laboratoriumsversuch.

Bodenmischung	Versuchsdatum 1936	mg N in 4 g							
		Erde vor Versuchsbeginn		Kontrollerde		V-Erde		Mo-Erde	
3 Teile Erde + 1 Teil Sand	4.—11. VIII.	—	—	2,32	2,35	2,52	2,86	2,83	2,86
	4.—25. VIII.	—	—	3,53	3,56	3,58	3,64	3,61	3,67
2 Teile Erde + 1 Teil Sand	5.—10. IX.	1,82	1,85	2,35	2,35	2,35	2,41	2,41	2,44
				2,35	2,38	2,44	2,46	2,44	2,46
	10. IX. bis 14. X.	1,82	1,85	2,63	2,66	2,66	2,69	2,74	2,74
				2,66	2,66	2,69	2,72	2,74	2,77
				2,69		—		2,77	

enthaltenden. Dieser zunächst unerwartete Einfluß der Beimischung größerer Sandmengen, die eine Verdünnung der ursprünglichen Molybdän- und Vanadiumkonzentration des Bodens und damit eine Erhöhung der Molybdän- und Vanadium-Düngewirkung bezweckte, ist vielleicht mit dem verschiedentlich nachgewiesenen fördernden Einfluß von Bodenkolloiden auf *Azotobacter* zu erklären (*Rippel*, 1936). Auch der Wetterfaktor kann hier eine ursächliche Rolle gespielt haben (*Stapp* und *Bortels*, 1936).

Von Freilandversuchen konnten bis jetzt erst zwei Böden des hiesigen Versuchsfeldes hinsichtlich der Wirkung einer Molybdän-Vanadiumdüngung auf ihren Stickstoffgehalt untersucht werden. Der eine von diesen trug seit 1932 bis zum Tage der Untersuchung im Frühjahr 1935 Luzerne, während der andere von 1932 bis 1934 verschiedene einjährige Leguminosen getragen und dann, als diese nicht mehr wachsen wollten, von 1934 bis 1935 brach gelegen hatte. Der Molybdän-Vanadium-Düngungsplan beider Flächen ist anderwärts[1] gegeben. Es muß natürlich dahingestellt bleiben, wieviel von dem Stickstoffgehalt der Böden der stickstoffbindenden Tätigkeit der Leguminosen-Knöllchenbakterien, und wieviel den frei im Boden lebenden Stickstoffbindern zu verdanken ist. Jedenfalls liegen die Werte für die mit Molybdat und Vanadat gedüngten Parzellen höher als für die Kontrollparzellen (Tabelle VII).

Tabelle VII. Einfluß einer Molybdän-Vanadium-Düngung auf den Stickstoffgehalt von Versuchsfeldboden.

Feldbezeichnung	mg N in 3 g			
	Kontrollerde		Mo—V-Erde	
Brache	2,9	3,0	3,6	3,4
Luzerne	3,0	2,8	3,3	3,3

[1] Siehe folgende Mitteilung, S. 20 u. 21.

Die fördernde Wirkung des Molybdäns und auch des Vanadiums und Wolframs auf die Mikroflora eines Bodens ist vielleicht am besten so zu erklären, daß zunächst besonders die stickstoffbindenden Mikroorganismen einschließlich der Knöllchenbakterien in ihrer Tätigkeit angeregt werden, daß dann infolge der stärker fließenden Stickstoffquelle (*Burk* und *Horner*, 1936) die Algen und die höheren Pflanzen stärker assimilieren und sich schneller vermehren bzw. stärker wachsen, wodurch wiederum die Kohlenstoffquelle (*Burgess*, 1930) für die Stickstoffbinder ergiebiger sein würde, so daß diese einen neuen starken Impuls bekämen usf. Nebenher wird wahrscheinlich auch der im Boden in ge-

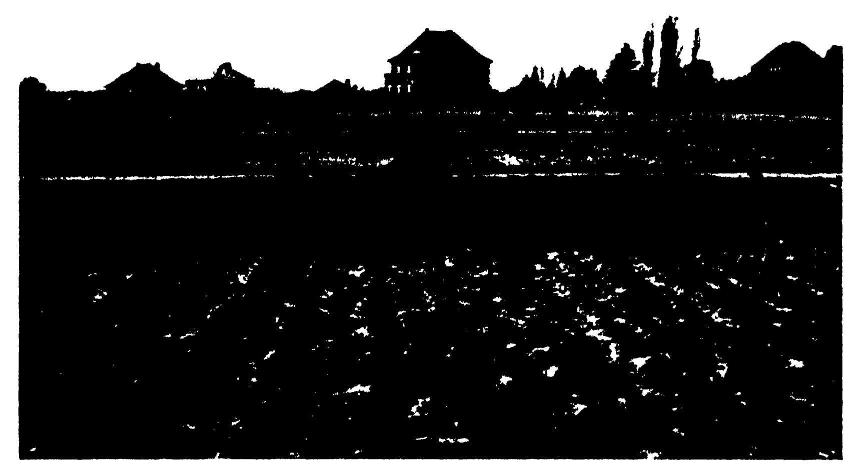


Abb. 4. Beschreibung im Text.

bundener Form vorliegende Stickstoff, vor allem Nitratstickstoff, von den stickstoffbindenden und vielleicht auch anderen niederen und höheren Pflanzen infolge der Molybdändüngung intensiver assimiliert werden. Das wäre ein wirksamer Schutz vor Stickstoffverlusten durch Nitratauswaschung. Im Enderfolg müßte sich so die Molybdänwirkung durch Belebung der gesamten Bodenflora und -fauna in einer Vermehrung des Bodenhumus und einer Verbesserung der Bodengare äußern.

Diese Vermutung bestätigte sich im Frühjahr 1935 an den soeben erwähnten Leguminosenfeldern nach der Brache. Die mit Molybdat und Vanadat gedüngten Parzellen waren deutlich dunkler gefärbt und von besserer Gare als die Kontrollparzellen. Im Vordergrund der Abb. 4 liegt eine Kontrollparzelle vor einer mit Molybdat gedüngten, die beide durch einen Weg getrennt waren, der nach dem Umpflügen durch vier Stäbe markiert worden ist. Daß der Humusgehalt der dunkler ge-

färbten Parzelle tatsächlich größer gewesen ist als derjenige der Kontrollparzelle, wird durch die beiden folgenden Beobachtungen noch wahrscheinlicher.

Der jeweils an 7 g Boden ermittelte Glühverlust von Proben beider Parzellen, die sich hinsichtlich Reaktion und Kalkgehalt nicht unterschieden, betrug in %

der Kontrollerde: 1,12, 1,27, 1,12,
der Mo-V-Erde: 1,33, 1,31, 1,32.

Ein guter Wertmesser für den Humuszustand und die Gare eines Bodens ist auch immer sein Bestand an Regenwürmern. Deshalb wurde im Frühjahr 1935 in der Mitte der beiden Parzellen von Abb. 4 gleichzeitig je 1 qm 15 cm tief nach Regenwürmern genau durchsucht mit dem Ergebnis, daß in dem Boden ohne Molybdändüngung 11 und in dem mit Molybdändüngung 33 gefunden wurden.

Der fördernde Einfluß des Molybdäns und vielleicht auch des Vanadiums auf die gesamte Lebewelt des Bodens, auf seinen Garezustand, ist also hier einmal besonders deutlich sichtbar geworden. Ob das allerdings unter den Verhältnissen, wie sie in der landwirtschaftlichen Praxis gegeben sind, so deutlich sein wird, ist zumindest fraglich. Denn eine den Humus- und Stickstoffgehalt eines Bodens so günstig beeinflussende Fruchtfolge wie Leguminosenanbau mit nachfolgender Brache kommt bei intensiv betriebener Landwirtschaft nicht in Frage. Auch konnte bei allen in anderer Weise hier ausgeführten Versuchen niemals ein ähnlicher Erfolg festgestellt werden. Immerhin scheint diese eine Beobachtung doch zu zeigen, daß die Stickstoffbindung und im Zusammenhang damit die Spurenelemente Molybdän, Vanadium und Wolfram Teile des Faktorenkomplexes darstellen, von dem die Bildung eines fruchtbaren Bodenhumus abhängig ist.

Zusammenfassung.

1. An leichten, aber landwirtschaftlich keinesfalls schlechten Böden wurde mit Hilfe der Erdplattenmethode nach *Winogradsky* festgestellt, daß Molybdän- und Vanadiumdüngungen den *Azotobacter*-Gehalt erhöhen.

2. Auch die Stickstoffbindung wird in diesen Böden nach den bisher vorliegenden Beobachtungen durch Molybdän- und Vanadiumdüngungen etwas gefördert.

3. Auf möglicherweise bestehende Zusammenhänge zwischen Molybdän, Vanadium und Wolfram und der Stickstoffbindung einerseits und der Entstehung von fruchtbarem Bodenhumus andererseits wurde hingewiesen.

Literatur.

H. Bortels, diese Zeitschr. 1, 333, 1930. — *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 87, 476, 1933. — *Derselbe*, Mitt. f. d. Landwirtsch. 49, 341, 1934. — *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 95, 193, 1936. — *P. S. Burgess*, Proceed. and Papers of the II. Intern. Congress of Soil Sc. Comm. 8, 42, 1930. — *D. Burk* u. *C. K. Horner*, Soil Sc. 41, 81, 1936. — *V. M. Goldschmidt*, Geologiska Föreningens i. Stockholm Förhandlingar 1934, S. 385. — *V. M. Goldschmidt* u. *Cl. Peters*, Nachr. v. d. Ges. d. Wissensch. zu Göttingen, Mathem.-Physik. Kl. 1933, S. 371. — *G. v. Hevesy*, *E. Alexander* u. *K. Wüstlin*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. 194, 315, 1930. — *K. Jost*, Chem. d. Erde 7, 177, 1932. — *H. Keller*, Zeitschr. f. Pflanzenern., Düngung u. Bodenkde. 88, 308, 1934. — *A. Koch*, Mikrobiologisches Praktikum, S. 177. Berlin, Jul. Springer, 1922. — *K. Konishi* u. *T. Tsuge*, Bull. Agric. Chem. Soc. of Japan 9, 129, 1933 (Jap. mit deutsch. Zusammenfassung). — *Dieselben*, (Fortsetzung), Bull. Agric. Chem. Soc. of Japan 10, 584, 1934 (Jap. mit deutsch. Zusammenfassung). — *C. B. van Niel*, diese Zeitschr. 6, 215, 1935. — *A. Rippel*, unter Mitwirkung von *Br. Lehmann*, ebenda 7, 210, 1936. — *C. Stapp* u. *H. Bortels*, Centralbl. f. Bakt. II, 94, 497, 1936. — *C. Stapp* u. *G. Ruschmann*, Arb. d. Biolog. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch. Berlin-Dahlem 13, 305, 1924. — *H. Ter Meulen*, Rec. d. Trav. Chim. d. Pays-Bas. 50, 491, 1931. — *H. Wenzl*, Centralbl. f. Bakt. II, 90, 289, 1934.

(Aus der Mikrobiologisch-chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Fortwirtschaft in Berlin-Dahlem.)

Über die Wirkung von Molybdän- und Vanadiumdüngungen auf Leguminosen.

Von

H. Bortels.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 13. November 1936.)

Nachdem 1933 (*Bortels*) in einer vorläufigen kurzen Mitteilung von der fördernden Wirkung des Molybdans und Vanadiums auf Wachstum und Stickstoffbindung der Leguminosen berichtet werden konnte, sollen nunmehr die vorliegenden Versuchsergebnisse zu dieser Frage veroffentlicht werden, wenngleich die Arbeiten auch heute noch nicht als abgeschlossen gelten können. Von Erfahrungen anderer Autoren auf diesem Gebiete ist bis jetzt erst wenig bekannt. *Dingwall, Mc Kibbin* und *Beans* (1934) haben Molybdan in Leguminosen sowohl als auch in Nichtleguminosen nachgewiesen und geben eine ausführliche Literaturübersicht über das Vorkommen des Molybdans in der Natur. Besonders wichtig für die hier gestellte Frage sind die vergleichenden Analysen *Ter Meulen*s (1931), aus denen hervorgeht, daß Leguminosen gegenüber anderen Pflanzen auffallend viel Molybdän enthalten (Tabelle I). Ferner haben *Scharrer* und *Schropp* (1934) an Wasser- und Sandkulturen von Getreidearten und Erbsen verschiedene Wirkungen von Molybdan und Wolfram beobachtet. Beide Elemente wirkten zum Teil fördernd, zum Teil schadigend. Die Pflanzen, auch die Erbsen, wurden aber in vollständigen nitrathaltigen Nahrlosungen gezogen, weshalb der Einfluß der Elemente Molybdan und Wolfram auf die Stickstoffbindung der Erbsen und ihrer Symbionten nicht untersucht werden konnte. Es scheint nach den Erfahrungen mit *Azotobacter* (*Bortels*, 1936), als ob auch bei diesen Versuchspflanzen in einigen Fällen Molybdän und besonders Wolfram die Aufnahme des Nitratstickstoffs gefordert hätten.

Das Ziel der eigenen Arbeiten war, den Einfluß des Molybdäns und des Vanadiums auf Stickstoffbindung und Wachstum verschiedener Leguminosen sowohl in Gefäßen mit Quarzsand als auch im Freiland nach Art und Größe festzustellen[1].

Gefäßversuche.

Von 1930 bis 1934 wurden in jedem Sommerhalbjahr einige der Orientierung dienende Sandkulturversuche mit verschiedenen Leguminosen in kleinem Umfange durchgeführt, von denen hier aber nur ganz kurz einige Beispiele gegeben werden sollen.

[1] Über die Ergebnisse ist von Herrn Oberregierungsrat Dr. *Stapp* im Rahmen eines Vortrages über die Physiologie stickstoffbindender Bakterien auf dem II. Internationalen Kongreß für Mikrobiologie in London im Juli 1936 bereits kurz berichtet worden.

32,5 kg gewaschener Untergrundsand des Dahlemer Versuchsfeldes wurden mit Leitungswasser und Nährsalzen in den folgenden auf 1 kg Sand berechneten Mengen gemischt: Wasser 100 ccm, $CaCO_3$ 3,0 g, $CaHPO_4$ 0,4 g, K_2SO_4 0,3 g, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 0,025 g, Fe_2Cl_6 Spur.

Nach Zugabe der Differenzdünger, und zwar 1. Kontrolle, 2. + 0,2 g NH_4NO_3 je kg Sand, 3. + 5 mg Na_2MoO_4 je kg Sand, 4. + 50 mg Na_2MoO_4 je kg Sand, 5. + 500 mg Na_2MoO_4 je kg Sand wurden die verschiedenen Mischungen, jeweils 6,5 kg Sand entsprechend, in fünf Blumentöpfe gefüllt, mit Erbsenknöllchenbakterien beimpft und am 27. Mai 1930 mit je fünf vorgekeimten Erbsen bepflanzt.

Am 5. Juni zeigten die Pflanzen in Gefäß Nr. 5 deutliche Schäden, nämlich braune und gelbe Verfärbungen der Blätter. Am kräftigsten hatten sich die Pflanzen in den Gefäßen Nr. 1 und 2 entwickelt. Am 25. Juni waren die Kontrollpflanzen in der Entwicklung hinter den mit Molybdän gedüngten der Gefäße Nr. 3 und 4 zurückgeblieben. Die Mo-Pflanzen hatten größere Fiederblättchen. Die ersten Blüten wurden verzeichnet bei den mit Stickstoff gedüngten Pflanzen am 3. Juli, bei den mit Molybdän gedüngten (Gefäß Nr. 3 und 4) am 5. Juli und bei den Kontrollpflanzen am 9. Juli.

Ein ähnlicher Versuch wurde 1933 mit Soja und Rotklee durchgeführt.

45 kg gewaschener Untergrundsand des Dahlemer Versuchsfeldes wurden mit folgender Grundnahrlosung gemischt, berechnet auf 1 kg Sand: Leitungswasser 100 ccm, $CaCO_3$ 1,5 g, $CaHPO_4$ 0,4 g, K_2SO_4 0,3 g, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 0,15 g.

Zehn Blumentopfe wurden mit je 4,5 kg dieser Mischung nach Zugabe folgender Differenzdünger gefüllt: 1. Kontrolle, 2. + 4 mg $NaVO_3$ je kg Sand, 3. + 4 mg Na_2MoO_4 je kg Sand, 4. + 4 mg $NaVO_3$, 4 mg Na_2MoO_4 je kg Sand, 5. + 0,2 g NH_4NO_3 je kg Sand.

Der nach Bedarf mit Leitungswasser gut durchfeuchtete und mit Knöllchenbakterien von Soja bzw. Rotklee beimpfte Sand wurde dann in der einen Serie von fünf Gefaßen am 4. Marz 1933 mit vorgekeimter Soja bepflanzt und in der anderen am 8. Mai 1933 mit Rotklee besat, wovon nach dem Auflaufen in jedem Gefäß 20 gleich kraftige Pflanzen belassen wurden.

Wie bei den meisten anderen dieser Versuche traten auch hier zunächst gewisse Schädigungen aller Versuchspflanzen auf, deren Ursache unbekannt geblieben ist. Die Blätter des Klees zeigten in einem bestimmten Entwicklungsalter in sämtlichen Gefäßen eigenartige Verbrennungserscheinungen. Außerdem war aber auch anfänglich eine Hemmung durch die für Sand offenbar zu stark bemessenen Molybdändüngungen und besonders durch die Vanadiumdüngungen unzweifelhaft zu erkennen. Jedoch erholten sich diese Pflanzen sehr bald und standen dann üppiger als die Kontrollpflanzen. Am 27. Juli wurden die Sojapflanzen geerntet, von denen die N-Pflanzen und die Mo-V-

Pflanzen das kräftigste Blattgrün zeigten gegenüber den etwas blasser gefärbten Kontrollen. Im lufttrockenen Zustande wogen

die Kontrollpflanzen	27,7 g
„ V-Pflanzen	34,5 g
„ Mo-Pflanzen	36,5 g
„ Mo-V-Pflanzen	30,5 g
„ N-Pflanzen	45,7 g

Stickstoffanalysen der Kontrollpflanzen und der Mo-V-Pflanzen ergaben für jene 3,0 %, für diese 3,5 % N. Am 4. August wurde die Kleeserie photographiert (Abb. 1). Die V-Pflanzen unterschieden sich



Abb. 1. Nähere Beschreibung im Text.

nicht mehr von den Kontrollpflanzen, während die Mo-Pflanzen durchschnittlich etwas dunkler grüne und etwas größere Fiederblättchen hatten. Noch mehr galt das für die Mo-V-Pflanzen, die sich in nichts von den N-Pflanzen unterschieden. Die Mo-Pflanzen hatten Blütenknospen gebildet, und die Mo-V-Pflanzen und N-Pflanzen blühten bereits.

Diese vorläufigen Versuche schienen trotz der nicht immer beobachteten und nur geringfügigen Ertragsteigerungen die Vermutung zu bestätigen, daß Molybdan und Vanadium die Stickstoffbindung der Leguminosen und ihrer Knöllchenbakterien ebenso fördern wie die der frei im Boden lebenden stickstoffbindenden Bakterien. Denn es muß berücksichtigt werden, daß die Kulturbedingungen für Leguminosen in Gefäßen mit Sand nur schwer wirklich optimal zu gestalten sind, und daß außerdem die Pflanzen im Samen einen beträchtlichen Vorrat an Molybdän mitbekommen. Das geht sehr deutlich aus den schon erwähnten Analysen *Ter Meulens* hervor, die zur besseren Veranschaulichung in Tabelle I (S. 16) wiedergegeben sind.

Der ausnahmslos hohe Molybdängehalt aller untersuchten Leguminosen fällt sofort auf und läßt Beziehungen zu der besonderen stickstoff-

Tabelle I. Molybdänbestimmungen nach Ter Meulen.

Substanz	mg Mo in 1 kg Substanz	Substanz	mg Mo in 1 kg Substanz
Kichererbsen	8,7—9,1	Kartoffelschalen	0,14
Pferdebohnen	5,5	Rosinen	0,08
Feuerbohnen	4,6	Bananenschalen	0,07
Weiße Bohnen	4,3	Geschälte Kartoffeln . .	0,06
Grüne Erbsen, trocken .	2,6—3,1	Eichenholz	0,06
Linsen	1,9	Preßhefe	0,04
Knoblauch	0,70	Geschälte Bananen . . .	0,03
Rübsaat	0,60	Roggenstroh	0,02
Roggen	0,62—0,72	Datteln	0,02
Mais	0,58	Kopfsalat	0,02
Reis	0,44	Gurken	0,01
Gerste	0,32	Geschälte Äpfel	0,01
Weizen	0,23	Blätter vom Gummibaum	0,003
Hafer	0,18	Weißer Rohrzucker . .	0,0

bindenden Fähigkeit dieser Pflanzengruppe vermuten. Die verhältnismäßig großen Molybdänreserven genügen auch offenbar zu einer ausreichenden Entwicklung und Fruchtbildung bei Molybdänmangel im Nährmedium.

Deshalb wurde 1934, um die gestellte Frage endgültig zu beantworten, dazu übergegangen, die Versuche mit mehreren Parallelkulturen in *Mitscherlich*-Gefäßen und reinem Quarzsand durchzuführen. Außerdem mußte versucht werden, durch Züchtung der Leguminosen in molybdänfreiem Sand diese im Verlauf mehrerer Generationen allmählich molybdänärmer zu machen.

Aus noch ungeklärten Gründen sind aber diese Versuche in Berlin-Dahlem sämtlich fehlgeschlagen. Bald nach dem Auflaufen bekamen alle Pflanzen, auch die Kontrollpflanzen, braune Blattränder, vergilbten dann und wuchsen nicht weiter. Der Knöllchenbesatz an den Wurzeln war normal. Eine Ursache für diese Krankheitserscheinung kann nicht angegeben werden, zumal gleichzeitig in Göttingen[1] genau in der gleichen Weise mit dem gleichen Material und denselben Samen angesetzte Versuche verhältnismäßig sehr gut gelangen. Der einzige Unterschied zwischen den Göttinger und den Berliner Versuchen bestand darin, daß dort Regenwasser, hier destilliertes Wasser verwendet worden war.

In den beiden folgenden, in Göttingen ausgeführten Versuchen wurde bisher nur der Einfluß des Molybdäns geprüft. Zur Verwendung kamen *Mitscherlich*-Gefäße mit je 7 kg Freienwalder Glassand in der Mischung der Sorten Nr. II und II N. Die Nährsalzmengen betrugen je Gefäß: $CaHPO_4$ 3,0 g, $CaSO_4$ 2,0 g, $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,5 g, $MgCl_2$ 0,3 g, $FeSO_4$ 0,1 g. Von den 20 Gefäßen erhielten 10 außerdem 5 mg Na_2MoO_4 je kg Sand. Die Hälfte der molybdänhaltigen und die Hälfte der Kontrollgefäße wurde dann am 29. Juni 1934 mit fünf vorgekeimten Felderbsen je Gefäß bepflanzt und am 3. Juli die andere Hälfte ebenso mit Soja.

[1] Den Herren Professor Dr. *Rippel* und Dr. *Behr* spreche ich für die freundliche Übernahme dieser Arbeiten meinen verbindlichsten Dank aus.

Die Sojapflanzen entwickelten sich in der Folgezeit ziemlich gut, die Erbsen aber nur schlecht. Vielleicht ist hierfür die späte Aussaatzeit verantwortlich zu machen. Eine Förderung durch Molybdän war bei Soja nicht zu erkennen. Die Mo-Pflanzen schienen sogar etwas schlechter entwickelt zu sein. Wahrscheinlich war die angewandte Molybdänkonzentration für reinen Sand schon zu groß, wie das auch aus den erwähnten Vorversuchen mit Untergrundsand hervorgeht.

Ende August wurden die Sojapflanzen und Anfang September die Erbsen geerntet, und zwar in beiden Fällen ungefähr zu Beginn der Blüte. In Tabelle II sind die Erntegewichte und Stickstoffbestimmungen zusammengestellt.

Tabelle II.

Versuchspflanze	Differenzdüngung	g lufttrockene Pflanzen	Mittel	g N je Gefäß	Mittel	N in %	Mittel
Soja	—	15,3 16,6 17,6 19,0 21,4	17,98	0,557 0,592 0,626 0,674 0,750	0,640	3,64 3,57 3,56 3,55 3,50	3,56
Soja	+ Mo	15,8 16,2 17,3 17,6 18,3	17,04	0,546 0,576 0,637 0,634 0,695	0,618	3,46 3,56 3,68 3,60 3,80	3,62
Erbsen	—	1,6 1,8 2,1 2,3 2,6	2,08	0,064 0,074 0,097 0,110 0,128	0,095	4,02 4,13 4,61 4,77 4,91	4,49
Erbsen	+ Mo	2,2 2,4 3,1 3,3 4,0	3,00	0,099 0,114 0,147 0,165 0,196	0,144	4,49 4,75 4,75 4,99 4,89	4,77

Wenn auch bei den Erbsen ein Erfolg der Molybdändüngung vorzuliegen schien, so konnte das Versuchsergebnis doch wegen der auffallend geringen Ernten nicht befriedigen. Soja hatte offenbar überhaupt nicht auf die Molybdändüngung reagiert.

1935 wurde der Versuch in erweiterter Form wiederholt. Außer Erbsen und Soja wurde auch Rotklee in die Untersuchung einbezogen. Molybdat wurde in geringerer Konzentration und außerdem gestaffelt gegeben. Eine Reihe erhielt in vierfacher Wiederholung je kg Sand = 1 mg, eine andere 3 mg Na_2MoO_4. Zur Grunddüngung wurden aber nur 1 bzw. 3 mg Na_2MoO_4 je Gefäß gegeben, anstatt 7 bzw. 21 mg. Die restlichen Mengen wurden in Dosen von 1 bzw. 3 mg in etwa wöchentlichen Abständen verabreicht. Die Aussaat erfolgte am 10. Mai 1935, für Soja in Wiederholung am 9. Juni, da die erste Aussaat kranken Samen enthielt. Von der Rotkleeaussaat wurden

nach dem Auflaufen an fünf Stellen des Gefäßes je zehn Pflanzen belassen. Sie wurden im Laufe des Sommers dreimal geschnitten und bekamen nach dem zweiten Schnitt eine zusätzliche Düngung von 0,5 g KH_2PO_4 und 0,5 g K_2SO_4 je Gefäß. In Tabelle III sind die Erntegewichte und in Tabelle IV die Ergebnisse der Stickstoffbestimmungen zusammengefaßt.

Tabelle III.

Versuchspflanze	Erntedatum 1935	Differenzdüngung	Ernte g lufttrocken				Mittel für 1 Gefäß	% Trockensubstanz	Trockensubstanz im Mittel für 1 Gefäß
			1	2	3	4			
Erbsen	15. VII.	—	18,5	13,3	15,1	12,0	14,7	94,2	13,85
	15. VII.	+ 1 Mo	12,9	14,9	11,4	10,9	12,5	93,8	11,72
	15. VII.	+ 3 Mo	11,3	11,1	10,6	7,7	10,2	93,9	9,58
Rotklee, 1. Schnitt	17. VII.	—	7,3	7,9	7,5	8,8	7,9	94,3	7,45
	17. VII.	+ 1 Mo	7,7	6,1	9,2	7,9	7,7	94,0	7,24
	17. VII.	+ 3 Mo	7,0	10,2	9,5	7,7	8,6	94,0	8,08
Rotklee, 2. Schnitt	13. VIII.	—	6,7	6,3	7,5	5,0	6,4	95,1	6,09
	13. VIII.	+ 1 Mo	6,2	7,5	7,3	7,5	7,1	95,3	6,77
	13. VIII.	+ 3 Mo	7,0	6,5	7,4	7,6	7,1	94,6	6,72
Rotklee, 3. Schnitt	16. IX.	—	8,0	4,4	6,9	5,3	6,15	95,5	5,87
	16. IX.	+ 1 Mo	6,9	8,1	8,1	6,9	7,5	95,1	7,13
	16. IX.	+ 3 Mo	6,3	6,1	6,7	5,7	6,2	94,9	5,88
Soja	16. IX.	—	35,9	30,8	33,7	41,0	35,35	95,2	33,65
	16. IX.	+ 1 Mo	41,2	32,6	40,4	39,5	38,4	94,7	36,36
	16. IX.	+ 3 Mo	38,1	35,1	26,8	36,5	34,1	94,3	32,16

Tabelle IV.

Versuchspflanze	Differenzdüngung	% N in der Trockensubstanz			g gesamte N-Ernte		
		a	b	Mittel	a	b	Mittel
Erbsen	—	2,40	2,18	2,29	0,332	0,302	0,317
	+ 1 Mo	2,53	2,53	2,53	0,297	0,297	0,297
	+ 3 Mo	2,38	2,43	2,40	0,228	0,233	0,230
Rotklee, 1. Schnitt	—	3,24	3,08	3,16	0,241	0,230	0,235
	+ 1 Mo	3,41	3,39	3,40	0,247	0,245	0,246
	+ 3 Mo	3,79	3,85	3,82	0,306	0,311	0,308
Rotklee, 2. Schnitt	—	3,75	3,75	3,75	0,228	0,228	0,228
	+ 1 Mo	4,21	4,15	4,18	0,285	0,281	0,283
	+ 3 Mo	3,88	3,76	3,82	0,261	0,252	0,257
Rotklee, 3. Schnitt	—	4,13	4,08	4,10	0,243	0,240	0,242
	+ 1 Mo	4,26	4,33	4,30	0,304	0,309	0,307
	+ 3 Mo	4,10	4,19	4,15	0,241	0,247	0,244
Soja	—	3,60	3,73	3,67	1,21	1,26	1,24
	+ 1 Mo	3,66	3,76	3,71	1,33	1,37	1,35
	+ 3 Mo	3,89	3,87	3,88	1,25	1,24	1,25

Auch bei diesem Versuch von 1935 hat sich gezeigt, daß in reinem Sand eine Molybdändüngung besonders vorsichtig dosiert werden muß, noch vorsichtiger als im Untergrundsand, und daß leicht anstatt einer Förderung der Stickstoffbindung und des Wachstums der Leguminosen eine Hemmung eintreten kann. Im Sand[1] kommen eben Sorptionskräfte längst nicht in dem Maße zur Wirkung wie im Boden, und hier vorhandene Antagonisten des Molybdäns können dort fehlen. So ist es vielleicht zu erklären, daß sowohl die dreifache als auch die einfache Molybdänkonzentration die Entwicklung der Erbsen nur gehemmt haben. Beim Rotklee und bei Soja ist zwar durch die einfache Molybdängabe die Ernte an Trockensubstanz und auch an Stickstoff erhöht worden, jedoch war die Wirkung nur gering. Immerhin muß hier die Stickstoffbindung eine Förderung erfahren haben. Die dreifache Molybdängabe hat bei Rotklee zunächst noch etwas stärker in diesem Sinne fördernd gewirkt. Eigenartigerweise hat diese Wirkung aber nach dem ersten Schnitt in dieser Reihe und nicht in der mit einfacher Molybdängabe mehr und mehr nachgelassen. Auch Soja ist durch die einfache Molybdängabe im Wachstum und in der Stickstoffbindung gefördert worden. Die dreifache Gabe scheint dagegen die Stickstoffbindung ebenfalls noch gefördert, das Wachstum aber bereits gehemmt zu haben. Es scheint fast, als könne die Molybdändüngung zu Sandkulturen deshalb nicht besser wirken, weil sich hier noch andere Ernährungsfaktoren im Minimum befinden.

Insgesamt hat sich ergeben, daß sich die Frage, ob Molybdän für die Stickstoffbindung der Leguminosen notwendig ist oder nicht, durch derartig angelegte Kulturversuche in Gefäßen mit Quarzsand nicht klar entscheiden läßt, wenigstens nicht während einer Vegetationsperiode. Selbst die dreimalige Ernte des Rotklees hat hierfür nicht ausgereicht. Deshalb wurde versucht, den Klee zu überwintern, und 1936 erneut zu ernten, bis zur möglichsten Molybdänerschöpfung der Kontrollen. Leider sind aber die Pflanzen im Winter eingegangen, so daß die Versuche 1936 erneut in Angriff genommen werden mußten und zur Zeit fortgesetzt werden.

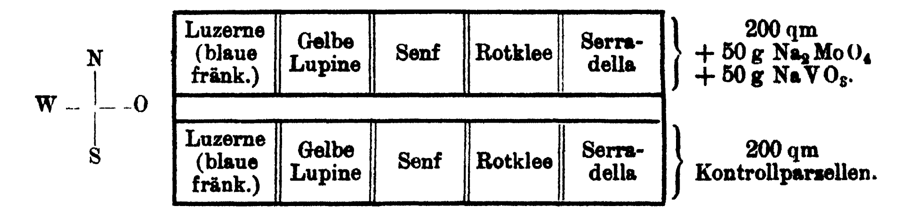
Freilandversuche.

Unberührt von den Ergebnissen der Vegetationsversuche in Sand bleibt die praktisch wichtige Frage, ob es landwirtschaftlich genutzte Böden gibt, die bei Leguminosenanbau Molybdän- oder Vanadium-

[1] Daß sich hier im Gegensatz zu Versuchen in Erde besondere Schwierigkeiten ergeben, ist auch aus dem Umstand zu ersehen, daß die Sandkulturversuche in Berlin-Dahlem aus noch unbekannten Gründen völlig mißlungen sind.

mangel zeigen, die also auf Molybdän- oder Vanadiumdüngung mit Ernteerhöhung ansprechen. Bis jetzt wurde in dieser Hinsicht nur der ziemlich leichte Boden (lehmiger Sand) des Dahlemer Versuchsfeldes der Biologischen Reichsanstalt untersucht, und zwar zum Teil mit positivem Ergebnis. Es ist aber zu erwarten, daß künftig auch von anderer Seite mit anderen Böden entsprechende Erfahrungen gemacht werden. Jedenfalls wäre es sehr zu wünschen, daß recht viele Böden, vor allem solche, die gewisse Leguminosenmüdigkeitserscheinungen zeigen oder gar keinen *Azotobacter* enthalten (*Stapp* und *Ruschmann*, 1924), auf ihren aufnehmbaren Molybdän- oder Vanadiumvorrat untersucht würden. Vielleicht ließe sich in manchen Fällen die Produktionskraft derartiger Böden durch Molybdän- oder Vanadiumdüngung steigern.

Auf dem Dahlemer Versuchsfeld wurde im Frühjahr 1932 auf einem Feldstück, das nur in dreijähriger Wiederholung, und zwar zuletzt 1931, Stallmist bekommen hatte, eine 4 ar große Fläche mit Kalk, Thomasmehl und Kali in üblicher Weise gedüngt. Die Düngung wurde in jedem Frühjahr der nächsten Jahre wiederholt. Die ganze Fläche erhielt dann die im folgenden wiedergegebene Aufteilung:



Zwischen der mit Molybdän und Vanadium gedüngten und der anderen Hälfte verlief ein 1 m breiter Weg. Die fünf mit verschiedenen Pflanzen bestandenen Felder waren durch 30 cm breite Zwischenräume getrennt. In der Folgezeit wurde als Differenzdüngung nur Molybdat ohne Vanadat gegeben in Mengen, die weiter unten in den Erntetabellen besonders aufgeführt sind.

Etwa vom 20. Juni an wurde vermerkt, daß sich sämtliche Leguminosen auf den mit Molybdat und Vanadat gedüngten Teilstücken üppiger entwickelt hatten als auf den anderen im Gegensatz zur Nichtleguminose Senf, die auf beiden Parzellen keinen Unterschied im Bestand erkennen ließ. Die Leguminosen waren auf den Mo-V-Parzellen dunkler grün, höher im Wuchs und hatten auch durchschnittlich etwas größere Blätter als auf den Kontrollparzellen. Besonders die Luzerne reagierte sehr stark auf die Mo-V-Düngung. Während die Kontrollpflanzen noch kaum eine Blüte gebildet hatten, stand die ganze Mo-V-Parzelle in voller Blüte und hatte auch schon reichlich Samen angesetzt. Die Samenernte betrug bei den Kontrollpflanzen ungefähr 35 g und bei den Mo-V-Pflanzen etwa 260 g.

Rotklee und Serradella sind infolge einer länger anhaltenden regenlosen Periode verkümmert und wurden nicht geerntet, sondern untergepflügt. Diese beiden Arten wurden deshalb auch nicht wieder in Versuch genommen. 1932 wurde das Erntegewicht an den auf dem Felde getrockneten Pflanzen ermittelt, in den folgenden Jahren aber an den frisch geschnittenen grünen Pflanzen, weil beim Trocknen durch Abfallen von Blättern und Samen zu große Verluste aufgetreten und die Ergebnisse deshalb unbrauchbar waren. Die Erträge der Luzerne wurden von 1933 bis 1936 jährlich festgestellt, die der Lupinen und des Senfs nur für 1933, weil der Boden nach dieser Zeit weder Lupinen noch Soja, Wicke oder Esparsette zu normaler Entwicklung brachte. Die Pflanzen zeigten starken Kümmerwuchs oder blieben ganz aus trotz Molybdändüngung, woraus geschlossen werden muß, daß Leguminosenmüdigkeit eines Bodens nicht immer allein auf Molybdänmangel zurückzuführen ist. Nach der Ernte am 7. Juli 1933 wurden die Lupinen auf den beiden entsprechenden Parzellen ausgebreitet und am 17. August untergepflügt. Dann bekamen beide, die Mo-V- und die Kontrollparzellen, je qm eine zusätzliche Düngung von 20 g Thomasmehl und 10 g Kali, und die Mo-V-Parzelle außerdem 0,2 g Na_2MoO_4. Am 18. August wurde dann auf diesen beiden Lupinenparzellen Senf gesät, um so nachzuweisen, daß durch die mit Molybdat und Vanadat gedüngten Lupinen tatsächlich mehr Stickstoff gebunden worden war[1]. Das mußte sich dann in einer größeren Senfernte auf der Mo-V-Parzelle äußern. Die Erntedaten von 1933 bis 1936 sind in den Tabellen V und VI zusammengestellt.

Auch aus diesen Erntezahlen geht hervor, daß Luzerne und Lupine durch die Mo-V-Düngung gefördert und zu stärkerer Stickstoffbindung angeregt wurden. Die Luzerneernten zeigten außerdem, daß die Molybdänmangelwirkung im ersten und zweiten Jahre (1932 bis 1933) am größten war. Dann aber trat sie allmählich weniger in Erscheinung

Tabelle V.

Jahr		kg Frischgewicht	
		Kontrollparzelle	Mo-V-Parzelle
			+ 0,2 g Na_2MoO_4 je qm
1933	1. Schnitt . .	44,0	60,5
	2. „ . .	57,7	65,2
	3. „ . .	42,1	45,6
1934	1. Schnitt . .	73,7	83,5
	2. „ . .	49,4	49,4
1935	1. Schnitt . .	113,5	111,5
			+ 0,5 g Na_2MoO_4 je qm
	2. „ . .	82,5	86,7
	3. „ . .	—	— (nicht gewogen)
			+ 0,2 g Na_2MoO_4 je qm
1936	1. Schnitt . .	111,6	119,5
	2. „ . .	68,2	67,2

[1] Die in der vorangehenden Mitteilung auf S. 9 aufgeführten Stickstoffbestimmungen, die sich auf die hier erwähnten Leguminosenböden beziehen, haben ebenfalls bewiesen, daß die Düngung mit Molybdat oder Molybdat und Vanadat die Stickstoffbindung gefördert hat.

Tabelle VI.

Versuchspflanze	kg Frischgewicht	
	Kontrollparzelle	Mo-V-Parzelle
Lupine	125,7	146,0
Senf	32,0	33,0
Senf im Nachbau auf Lupinenparzelle	85,0	99,0

1	—
2	+ Mo
3	+ V
4	+ Mo + V
5	—
6	+ Mo
7	+ V
8	+ Mo + V
9	—
10	+ Mo
11	+ V
12	+ Mo + V
13	+ Mo + V
14	+ V
15	+ Mo
16	—
17	—
18	+ Mo
19	+ V
20	+ Mo + V

N W O S

in dem Maße, wie die Pflanzen mit ihren Wurzeln größere Bodentiefen erreichten. Wahrscheinlich wurde dieser Ausgleich dadurch noch verstärkt, daß in diesem wie in einem später noch zu erwähnenden mehrjährigen Luzerneversuch im zweiten Anbaujahr jede zweite Reihe einer jeden Parzelle ausgehackt wurde. Die zerfallenden Wurzelrückstände werden den Nachbarreihen Stickstoff wie Molybdän geliefert haben.

Ein weiterer Versuch mit Luzerne wurde 1933 in unmittelbarer Nähe des eben erwähnten Feldstückes auf einem in ähnlicher Weise vorbehandelten Boden angelegt, der ebenfalls in dreijähriger Wiederholung, zuletzt 1931, Stallmist bekommen hatte. Diesmal wurden aber die verschieden gedüngten Parzellen in fünffacher Ausführung, wie die nebenstehende Skizze zeigt, angeordnet.

Jedes Teilstück war 7,5 qm groß und wurde vom Nachbarstück durch einen 1,3 m breiten Weg getrennt. Die Grunddüngung war hier wie in den bereits erwähnten und allen folgenden Versuchen die gleiche. Auch wurden die Molybdan- und Vanadiumsalze immer in Wasser gelost mit der Gießkanne gleichmäßig auf den einzelnen Feldern verteilt. In diesem Versuch kamen 0,5 g Na_2MoO_4 bzw. $NaVO_3$ zur Anwendung, d. h. 3,75 g je Parzelle. Am 11. März 1933 wurde das ganze Feld gleichmäßig mit Bastardluzerne besat und am 22. April mit einer Bodenaufschwemmung eines mit Luzerne bestandenen Feldes beimpft.

Während des Wachstums der Luzerne wurden auch von uneingeweihten Personen die Bestände

Tabelle VII.

Differenzdüngung	Teilstück Nr.	kg Frischgewicht je Teilstück	kg Frischgewicht im Mittel	Differenzdüngung	Teilstück Nr.	kg Frischgewicht je Teilstück	kg Frischgewicht im Mittel
—	1	9,4		+ V	3	16,5	
	5	14,4			7	15,8	
	9	12,3	12,1		11	15,4	15,8
	13	14,9			14	15,4	
	17	9,3			19	16,0	
+ Mo	2	11,8		+ Mo + V	4	14,7	
	6	17,1			8	13,3	
	10	17,5	15,2		12	13,5	14,3
	15	16,5			13	14,3	
	18	13,0			20	15,8	

der Kontrollparzellen durchweg als die schlechtesten und die mit Molybdat gedüngten als die besten bezeichnet. Die am 5. August vorgenommene Ernte (Tabelle VII) hat diese Begutachtung bestätigt.

Wenn auch die in gleicher Weise behandelten Teilstücke große Schwankungen in den Erntegewichten aufweisen, so ist doch der günstige Einfluß der Molybdän- und auch der Vanadiumdüngung nicht zu verkennen, besonders dann, wenn jeweils zwei benachbarte Parzellen der Kontrolle und der Molybdändüngung miteinander verglichen werden. Die auffallend niedrigen Werte der Parzellen 1 und 17 und 2 und 18 beruhen auf Bodensäure (p_H 5,8 bis 6,0), so daß bei annähernd neutraler Reaktion aller Parzellen der Erntemittelwert der Kontrollflächen bei 13,5 bis 14,0 und derjenige der Mo-Flächen bei etwa 17,0 liegen würde.

1934 wurde ein größerer Molybdändüngungsversuch zu Luzerne angelegt auf einer Fläche, die als eine der besten des ganzen Versuchsfeldes gilt und in zweijähriger Wiederholung, zuletzt 1933, mit Stallmist gedüngt worden war. Die Aufteilung der Fläche wurde wie folgt vorgenommen:

Die 64 qm großen Teilstücke waren durch 1,5 m breite Wege voneinander getrennt. Am 17. April wurde eine Differenzdüngung von 0,5 g Na_2MoO_4 je qm gegeben und auf der ganzen Fläche am 20. April mit der Drillmaschine Luzerne („Mahndorfer blaue Victoria") einge-

N

W O

S

1 —	1 + Mo
2 + Mo	2 —
3 —	3 + Mo
4 + Mo	4 —

Tabelle VIII.

Erntedatum		Flächenpaar Nr.	kg Frischgewicht Kontrollparzellen	kg Frischgewicht Mo-Parzellen
1934	1. Schnitt	—	—	—
	2. „	1	96,7	104,2
		2	91,2	93,9
		3	87,8	90,6
		4	95,4	96,0
1935	1. Schnitt	1	203,8	218,2
		2	218,0	212,5
		3	220,3	219,1
		4	227,5	219,1
				+ 0,5 g Na_2MoO_4 je qm
	2. Schnitt	1	86,2	105,0
		2	90,0	87,2
		3	89,0	97,8
		4	97,2	97.5

sät, die vorher mit Knöllchenbakterien infiziert worden war. Die erste Ernte des Jahres 1934 konnte wegen der großen Dürreperiode nicht ausgewertet werden. Die zweite und zwei weitere Ernten im Jahre 1935 sind in Tabelle VIII zusammengestellt.

Eine eindeutig fördernde Wirkung des Molybdäns zeigen diese Zahlen nicht. Sie scheinen vielmehr zu beweisen, daß auf einem landwirtschaftlich gut gepflegten Boden ein bei Leguminosenanbau erkennbarer Molybdänmangel nicht so leicht zu befürchten ist. Jedoch war selbst auf dieser Versuchsfläche der Vorrat an verfügbarem Molybdän in der Ackerkrume nicht so groß, daß *Azotobacter* hier optimale Lebensbedingungen vorgefunden hätte. Aus den in der vorangehenden Mitteilung[1] veröffentlichten Zahlen geht hervor, daß der *Azotobacter*-Gehalt nach etwa einem halben Jahr auf den mit Molybdän gedüngten Parzellen deutlich größer war.

Schließlich mag noch ein Molybdän- und Vanadiumdüngungsversuch zu gelben Lupinen erwähnt werden, der 1933 auf einer Fläche des Versuchsfeldes angelegt wurde, die als verhältnismäßig gut bezeichnet werden muß. Die Vorbehandlung des Bodens war die gleiche, wie bei dem soeben erwähnten Versuch.

Acht Teilstücke von je 24 qm Größe waren durch 1 m breite Wege voneinander getrennt und erhielten zum Teil als Differenzdüngung je qm 0,6 g Na_2MoO_4 oder 0,6 g $NaVO_3$ oder beides. Die Anordnung der Teilstücke ist der beigefügten Skizze zu entnehmen, und die Ernten sind in Tabelle IX zusammengestellt.

Diesen Zahlen muß noch hinzugefügt werden, daß die Grünmassen der Parzellen 5 bis 8 nach dem Schnitt infolge eines Mißverständnisses

[1] Diese Zeitschr. 8, 6, 1937.

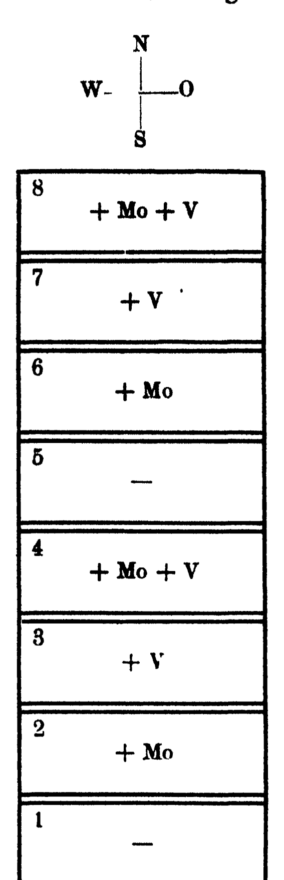


Tabelle IX.

Differenzdüngung	Teilstück Nr.	kg Frischgewicht je Teilstück	kg Frischgewicht im Mittel
—	1 5	87,7 73,6	80,7
+ Mo	2 6	115,5 89,1	102,3
+ V	3 7	102,2 90,7	96,5
+ Mo + V	4 8	92,3 92,2	92,3

länger gelegen haben als diejenigen der Parzellen 1 bis 4, bevor sie gewogen wurden. Bei allen anderen Versuchen wurde immer darauf geachtet, daß die stets in der Blüte geschnittenen Pflanzen einer Parzelle sofort gewogen wurden, ehe die Ernte der nächsten Parzelle begann. Jedenfalls hat auch dieser Versuch einen kleinen Erfolg der Molybdän- wie der Vanadiumdüngung gebracht. Es scheint, als ob die Kombination Mo + V hier wie bei dem Luzerneversuch von 1933 nicht so günstig wirkte wie Molybdän oder Vanadium allein. Möglicherweise ist das schon die Folge einer Überdosierung.

Abschließend kann aus den Freilandversuchen gefolgert werden, daß Molybdän- wie Vanadiumdüngungen die Ernte verschiedener Leguminosen erhöhen können auf Böden, die infolge unzureichender Düngung mit Stallmist oder Kompost oder anderweitiger unsachgemäßer Behandlung an diesen beiden Schwermetallen verarmt sind. Welche Mengen im einzelnen Falle zu verabreichen sind, kann nicht vorausgesagt werden und ist jeweils experimentell zu ermitteln.

Nach Abschluß der vorliegenden Versuche erschien eine zweite Mitteilung von *Merkenschlager* (1936) über den Rotklee als Konstitution der „Urwiese". An Hand von Gefäß- und Wasserkulturversuchen hat Verfasser ebenfalls feststellen können, daß Rotklee im Gegensatz zum Senf durch vorsichtig dosierte Molybdängaben gefördert wird, besonders auf kleemüdem Boden. Er hat ferner in Bestätigung der hier mitgeteilten Versuchsergebnisse gefunden, daß Molybdän die Blühwilligkeit des Klees fördert, und daß auch bei gelber Lupine die Ernten u. U. durch Molybdändüngung gesteigert werden können. Es geht auch aus diesen Untersuchungen hervor, daß die Leguminosen im Gegensatz zu nicht stickstoffbindenden Pflanzen eine auffallende Molybdänbedürftigkeit zeigen.

Zusammenfassung.

1. Sandkulturversuche mit Erbsen, Soja und Rotklee haben in ihrer Mehrzahl ergeben, daß Stickstoffbindung und Wachstum der Leguminosen durch vorsichtig dosierte Molybdän- und Vanadiumdüngung gefördert werden können. Ob, wie aus theoretischen Überlegungen heraus angenommen werden muß, Molybdän oder Vanadium hierfür unbedingt notwendig sind, ist vorläufig nicht erwiesen.

2. Es besteht die Möglichkeit, daß auf einseitig ausgenutzten und unzureichend gedüngten Böden Leguminosenernten durch zusätzliche Düngung mit Molybdän- oder Vanadiumsalzen erhöht werden können.

3. Entsprechend den bei *Azotobacter* angestellten Beobachtungen werden offenbar auch Stickstoffbindung und Wachstum der Leguminosen, soweit das bis jetzt festgestellt werden konnte, durch Molybdän stärker gefördert als durch Vanadium.

Literatur.

H. Bortels, Centralbl. f. Bakt. II, 87, 476, 1933. — *Derselbe*, ebenda II, 95, 193, 1936. — *A. Dingwall, R. R. Mc Kibbin* u. *H. T. Beans*, Canadian J. of Research. 11, 32, 1934. — *F. Merkenschlager*, Prakt. Blätter f. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz. 14, 164, 1936. — *K. Scharrer* u. *W. Schropp* ,Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkde. (A) 34, 312, 1934. — *C. Stapp* u. *G. Ruschmann*, Arb. d. Biolog. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch. Berlin-Dahlem. 13, 305, 1924. — *H. Ter Meulen*, Rec. d. Trav. Chim. d. Pays-Bas. 50, 491, 1931.

(Aus dem Botanischen Institut der königl. ung. Universität für die technischen und wirtschaftlichen Wissenschaften in Sopron, Ungarn.)

Vergleichende Untersuchungen über den biologischen Aktivitätsgrad der Böden.

Von

D. Fehér und M. Frank.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Dezember 1936.)

In einer früheren Arbeit hat *Fehér* (3) den Begriff des Aktivitätsgrades des Bodens eingeführt. Damit wird die biologische Fähigkeit des Bodens bezeichnet, gewisse biochemische und biophysikalische Änderungen in seinem allgemeinen biologischen Zustande derart durchzuführen, daß diese mit einer entsprechenden Methode quantitativ erfaßt werden können. Dieser Begriff wurde an Stelle der bisher üblichen Bakterienzahlen eingeführt, die im absoluten Sinne nur schwer zu gebrauchen waren, abgesehen davon, daß die mit den verschiedenen Methoden festgestellten Bakterienzahlen auch erheblich voneinander abweichen und infolgedessen keine Anhaltspunkte dazu bieten, die biologische Aktivität eines Bodens in absolutem Sinne und unabhängig von den äußeren Faktoren bestimmen zu können. Die jeweils ermittelten Bakterienzahlen ergeben immer eine Momentaufnahme von dem jeweiligen biologischen Zustand des Bodens im Zeitpunkt der Untersuchung. Um den biologischen Aktivitätsgrad eines Bodens deutlich charakterisieren zu können, ist es auch notwendig, ihn unabhängig von den jeweiligen Klimafaktoren bestimmen oder wenigstens annäherungsweise voraussehen zu können. Bevor wir auf die nähere Besprechung dieser Möglichkeiten eingehen werden, möchten wir die Ergebnisse mitteilen, die wir mit der vergleichenden Anwendung der Plattenmethode und der für die Ermittlung des Aktivitätsgrades von *Fehér* ausgearbeitete p_H-Methode (1) ermittelt haben.

Untersuchungsmethodik.

Die eingehendere Beschreibung der angewendeten, in der Literatur bereits ausführlich beschriebenen (1) Untersuchungsmethoden erübrigt sich hier. Wir möchten nur so viel erwähnen, daß wir, wie bereits angegeben, die übliche Plattenmethode und die p_H-Methode von *Fehér* (3) angewendet haben. Bei der Plattenmethode wurden aerobe und anaerobe Bakterien getrennt bestimmt. Bezüglich der p_H-Methode möchten wir kurz nur angeben, daß diese Methode als Kulturmedium den gleichen Boden verwendet, der zur Untersuchung gelangt. Es werden verschiedene Verdünnungen nach der Tabelle I hergestellt und auf das vorher sorgfältig

Tabelle I.

Aktivitätsgrad	Verdünnungsgrad	Aktivitätsgrad	Verdünnungsgrad	Aktivitätsgrad	Verdünnungsgrad
0,0001	1 : 100	1,00	1 : 1 000 000	11,1	1 : 11 100 000
0,001	1 : 1 000	1,11	1 : 1 100 000	12,5	1 : 12 500 000
0,005	1 : 5 000	1,25	1 : 1 250 000	14,3	1 : 14 300 000
0,01	1 : 10 000	1,43	1 : 1 430 000	16,7	1 : 16 700 000
0,025	1 : 25 000	1,67	1 : 1 670 000	20,0	1 : 20 000 000
0,05	1 : 50 000	2,0	1 : 2 000 000	25,0	1 : 25 000 000
0,067	1 : 67 000	2,5	1 : 2 500 000	33,0	1 : 33 000 000
0,1	1 : 100 000	3,3	1 : 3 300 000	50,0	1 : 50 000 000
0,25	1 : 250 000	5,0	1 : 5 000 000	67,0	1 : 67 000 000
0,50	1 : 500 000	6,7	1 : 6 700 000	100,0	1 : 100 000 000
0,67	1 : 670 000	10,0	1 : 10 000 000		

sterilisierte Kulturmedium überimpft. Man bestimmt durch elektrophysikalische Bestimmung der p_H-Zahl der einzelnen Kulturröhren, die Verdünnungsgrenzen, bei der noch eine Änderung der Azidität eingetreten ist. Diese Verdünnungsgrenzen werden als Aktivitätsgrade des Bodens bezeichnet. Die p_H-Änderungen sind als ein komplexer Ausdruck aller biologischer und biochemischer Änderungen aufzufassen, die sich in den untersuchten Böden abgespielt haben.

Der Vorteil dieser neuen Methode ist vor allem darin zu suchen, daß sie die bisher üblichen Kulturmedien verwirft, den Boden selbst als Nährsubstrat verwendet und nicht die Zahl der Mikroorganismen, sondern ihre Leistung bestimmt. Allerdings erleidet natürlich der Boden auch gewisse Änderungen beim Sterilisieren. Namentlich die organischen Humusverbindungen und alle kolloidalen Bestandteile des Bodens werden wahrscheinlich gewisse Umsetzungen erfahren. Dieser Nachteil konnte bisher noch nicht beseitigt werden. Aber auch in diesem Zustande wird der Boden ein viel geeigneteres und viel natürlicheres Nährmedium sein als die bisher verwendeteten flüssigen und festen, in jeder Hinsicht künstlichen Nährböden. Namentlich der Umstand, daß die Zahlen, die mit der neuen Methode gewonnen werden, immer höher sind als die Bakterienzahlen der alten Methode, deuten darauf hin, daß die Anwendung des Bodens als Nährsubstrat für die Mikroorganismen viel günstigere Lebensbedingungen schafft als die Anwendung der bisher üblichen künstlichen Nährböden.

Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse haben wir in den Tabellen II und III und in den Abb. 1 (S. 31) und 2 (S. 32) dargestellt. Zum besseren Verständnis sind in Tabelle I auch die Aktivitätsgrade angegeben, die den angewendeten Verdünnungen entsprechen. In den Tabellen haben wir außerdem auch die Verhältniszahlen zwischen den mit Hilfe der Plattenmethode gewonnenen Werten und den nach der p_H-Methode gewonnenen Aktivitätsgraden aufgeführt. Außerdem sind auch noch die Mikro-

Tabelle II.

Zeitpunkt		p_H-Methode			Plattenmethode			p_H-Methode / Plattenmethode			R	Aktivitätsgrad	p_H Methode	Platten Methode
		aerob	anaerob	insgesamt	aerob	anaerob	insgesamt	aerob	anaerob	insgesamt			max./min	max./min.
Versuchsfläche 15														
1934	Jan	14 300 000	5 000 000	19 300 000	3 700 000	900 000	4 600 000	3,86	5,5	4,19	226	19,3	3,5	3,7
	März	16 700 000	3 300 000	20 000 000	4 200 000	1 000 000	5 200 000	3,9	3,3	3,84	230	20,0		
	Mai	50 000 000	5 000 000	55 000 000	8 600 000	1 100 000	9 700 000	5,8	4,5	5,67	229	55,0		
	Juli	67 000 000	2 000 000	69 000 000	15 800 000	1 300 000	17 100 000	4,24	1,53	4,0	273	69,0		
	Nov	50 000 000	1 250 000	51 250 000	4 400 000	300 000	4 700 000	11,6	4,16	10,9	187	51,2		
1935	Jan	10 000 000	1 000 000	11 000 000	2 900 000	800 000	3 700 000	3,44	1,25	2,97	190	11,0	3,3	2,03
	Mai	33 000 000	3 300 000	36 300 000	5 400 000	700 000	6 100 000	6,11	4,88	5,9	252	36,3		
	Aug.	20 000 000	6 700 000	26 700 000	2 500 000	500 000	3 000 000	8,00	1,34	8,8	146	26,7		
	Nov	25 000 000	2 500 000	27 500 000	3 600 000	400 000	4 000 000	6,9	6,25	6,87	174	27,5		
1936	Jan	16 700 000	2 000 000	18 700 000	1 500 000	100 000	1 600 000	11,1	20,0	11,6	193	18,7	1,4	2,4
	Mai	25 000 000	1 430 000	26 430 000	2 800 000	1 200 000	4 000 000	8,9	1,19	6,6	280	26,4		
Versuchsflache 14.														
1934.	Jan.	14 300 000	6 700 000	21 000 000	3 700 000	1 200 000	4 800 000	3,8	5,58	4,3	221	21,0	3,3	3,2
	Marz	20 000 000	6 700 000	26 000 000	5 000 000	1 000 000	6 000 000	4,0	6,7	4,45	230	26,7		
	Mai	33 000 000	5 000 000	38 000 000	5 700 000	1 100 000	6 800 000	5,79	4,54	5,58	222	38,0		
	Juli	67 000 000	2 000 000	69 000 000	15 000 000	1 300 000	16 300 000	4,46	1,53	4,5	278	69,0		
	Nov	50 000 000	1 250 000	51 250 000	4 400 000	1 200 000	5 600 000	11,0	10,4	9,15	180	51,3		
1935.	Jan	10 000 000	1 000 000	11 000 000	2 900 000	800 000	3 700 000	3,44	1,25	2,97	199	11.0	3,1	1,8
	Mai	20 000 000	2 000 000	22 000 000	6 000 000	500 000	6 500 000	3,33	4,0	3,38	260	22,0		
	Aug	25 000 000	1 250 000	27 250 000	4 200 000	500 000	4 700 000	7,85	2,5	7,28	150	27,2		
	Nov	25 000 000	2 000 000	27 000 000	2 900 000	600 000	3 500 000	8,0	3,33	7,7	179	27,0		
1936	Jan	14 300 000	2 500 000	16 800 000	1 300 000	200 000	1 500 000	11,0	12,5	11,2	197	16,8	2,1	3,3
	Mai	33 000 000	2 500 000	35 500 000	3 300 000	1 700 000	5 000 000	10,0	14,7	7,1	289	35,5		

Tabelle III.

Zeitpunkt		p_H-Methode			Plattenmethode			p_H-Methode / Plattenmethode			R	Aktivitätsgrad	p_H Methode	Platten Methode
		aerob	anaerob	insgesamt	aerob	anaerob	insgesamt	aerob	anaerob	insgesamt			max/min	max/min
						Versuchsflache 24								
1934	Jan	14 300 000	5 700 000	20 000 000	3 800 000	1 000 000	4 800 000	3,76	5 7	4,16	230	20	3,4	3,16
	Marz	16 700 000	3 300 000	20 000 000	7 100 000	800 000	7 900 000	2,35	4,12	2,53	243	20		
	Mai	33 000 000	3 000 000	36 000 000	7 500 000	1 200 000	8 700 000	4,4	2,5	4,14	276	36		
	Juli	67 000 000	1 000 000	68 000 000	14 000 000	1 200 000	15 200 000	4,5	4,16	4,47	317	68		
	Nov.	50 000 000	1 000 000	51 000 000	5 800 000	1 000 000	6 800 000	8,6	1,00	7,5	291	51		
1935	Jan.	10 000 000	1 000 000	11 000 000	4 700 000	400 000	5 100 000	2,1	2,5	2,15	266	11	3,6	1,6
	Mai	33 000 000	6 700 000	39 700 000	7 600 000	600 000	8 200 000	4,34	11,1	4,84	271	39,7		
	Aug.	33 000 000	5 000 000	38 000 000	6 000 000	500 000	6 500 000	5,5	10,0	5,84	269	38		
	Nov.	33 000 000	2 000 000	35 000 000	5 600 000	500 000	6 100 000	5,8	4,00	5,73	227	35		
1936.	Jan.	14 300 000	1 670 000	15 970 000	5 000 000	750 000	5 750 000	2 8	2,2	2,77	196	15,9	3,3	1,6
	Mai	50 000 000	3 300 000	53 300 000	8 000 000	1 600 000	9 600 000	6 2	2,06	5,55	289	53,3		
						Versuchsflache 20 b								
1934.	Jan	14 300 000	6 700 000	21 000 000	2 900 000	1 200 000	4 100 000	4,9	5,5	5,12	238	21	3,4	4,6
	Marz	16 700 000	6 700 000	23 400 000	4 200 000	800 000	5 000 000	3,9	8,37	4,68	264	23,4		
	Mai	33 000 000	5 000 000	38 000 000	7 300 000	1 200 000	8 500 000	4,5	4,16	4,5	259	38		
	Juli	67 000 000	5 000 000	72 000 000	18 000 000	1 000 000	19 000 000	3,6	5,00	3,78	317	72		
	Nov.	20 000 000	5 000 000	25 000 000	6 000 000	1 200 000	7 200 000	3,3	4,16	3,47	229	25		
1935.	Jan.	14 300 000	2 500 000	16 800 000	3 000 000	500 000	3 500 000	4,76	5,00	4,8	270	16,8	1,6	2,25
	Mai	20 000 000	1 670 000	21 670 000	6 800 000	800 000	7 600 000	2,9	2,08	2,85	294	21 6		
	Aug.	25 000 000	6 700 000	31 700 000	6 500 000	1 400 000	7 900 000	3,8	4,8	4,01	218	31,7		
	Nov.	25 000 000	2 000 000	27 000 000	4 900 000	500 000	5 400 000	5,1	4,0	5,00	215	27,0		
1936	Jan.	12 500 000	2 500 000	15 000 000	2 500 000	500 000	3 000 000	5,00	5,00	5,00	196	15	3,5	3,8
	Mai	50 000 000	2 500 000	52 500 000	11 000 000	400 000	11 400 000	4,5	6,2	4,6	289	52,5		

organismenzahlen angegeben, die theoretisch den einzelnen angewendeten Verdünnungsgraden entsprechen. Wir möchten aber betonen, daß

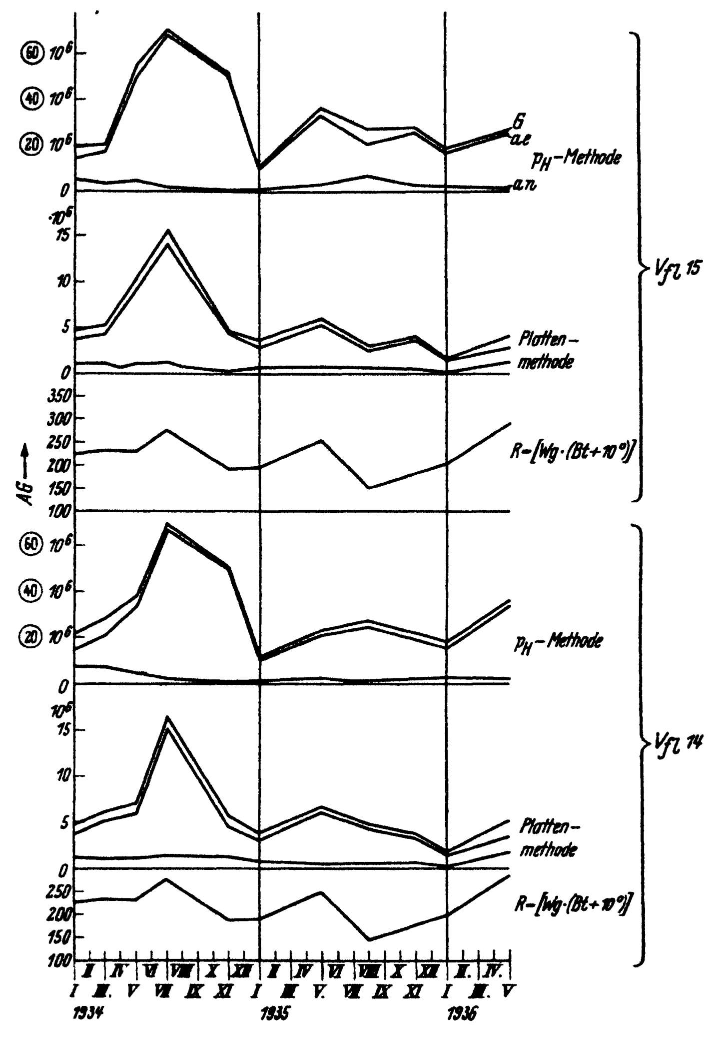


Abb. 1. Vergleichende Darstellung der mit der p_H-Methode und mit der Plattenmethode gewonnenen Bakterienzahlen.

AG = Aktivitätsgrad
G = Gesamtbakterienzahl }
ae = aerobe Bakterien } pro Gramm Erde
an = anaerobe Bakterien }
R = Wassergehalt × (Bodentemperatur + 10).

die Anführung dieser Zahlen nur ein technisches Mittel bedeutet, da wir wirkliche Bedeutung nur den einzelnen angeführten Aktivitäts-

graden beimessen. Es ist klar, daß die Zahlen, die die Aktivitätsgrade ausdrücken, an und für sich bedeutungslos sind. Sie gewinnen aber ihre Bedeutung, wenn wir auf Grund der mitgeteilten Tabellen und auf Grund der Aktivitätsgrade bzw. auf Grund dieser Zahlen uns die Verdünnungen vorstellen, die in dem betreffenden Boden noch eine Änderung seines ursprünglichen physikochemischen Zustandes hervorrufen können. Aber gerade durch diesen Umstand wird die Eigenart der p_H-Methode begründet. Alle übrigen indirekten Methoden sind einseitig. Sie bestimmen die verschiedenen Gruppen der Mikroorganismen auf Grund ihrer Reinkultur und auf Grund ihrer morphologischen Erscheinungsformen. Die p_H-Methode dagegen bestimmt die gesamte Arbeitsleistung aller in dem Boden befindlichen Mikroorganismen. Die Aktivitätsgrade bedeuten also eine quantitativ streng umschriebene energetische Leistung; infolgedessen sind sie von den bisher auf ubliche Weise angegebenen Bakterienzahlen wesentlich verschieden. Sie enthalten nicht nur das quantitative Mengenverhältnis, sondern auch die quantitative Arbeitsleistung, die nicht nur von der Zahl der Mikroorganismen, sondern auch von der Intensität ihrer Energieumsetzungen abhängt. Falls wir also im Rahmen dieser Arbeit noch überhaupt von Mikroorganismenzahlen der p_H-Methode sprechen, so geschieht dies nur, um diese mit den übrigen Methoden wenigstens annäherungsweise

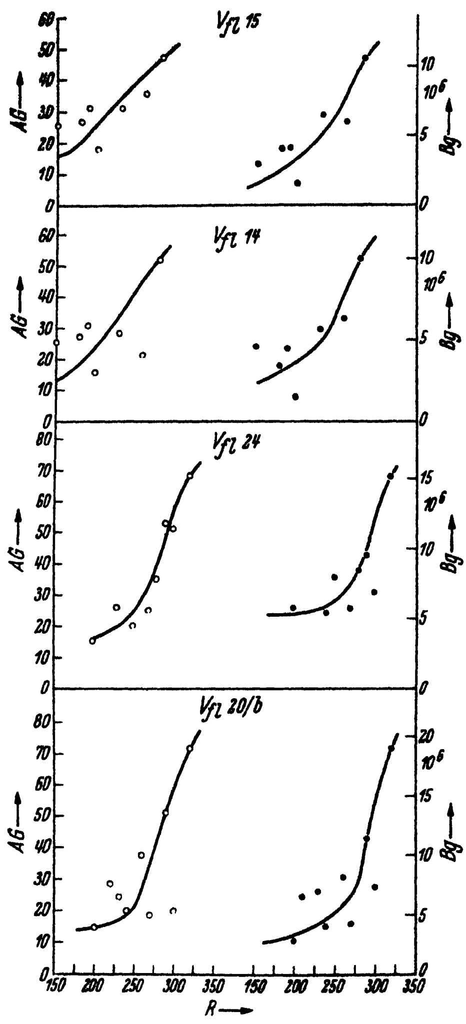


Abb 2. Der quantitative Zusammenhang zwischen den R-Werten [Wassergehalt des Bodens × (Bodentemperatur + 10)] und zwischen dem Aktivitätsgrad bzw. Bakteriengehalt.

AG = Aktivitätsgrad
Bg = Bakteriengehalt.

vergleichen zu können. Da aber die Zahlen der indirekten Methoden nur das Mengenverhältnis der verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen angeben, so ist der Vergleich nur bedingt und nur unter Berücksichtigung der vorher dargestellten Eigenart der p_H-Methode, die auch die Arbeitsintensität angibt, möglich.

Die Untersuchungen wurden auf folgenden Versuchsflächen durchgeführt:

Versuchsfläche 14. Gut geschlossener, etwa 80jähriger Fichtenwald, etwas mit Lärche gemischt, Bestandsschluß 1,0.

Versuchsfläche 15. Durchforsteter Fichtenwald von mittlerem Alter mit dem Bestandsschluß 0,8. Beide Versuchsflächen liegen dicht nebeneinander, ungefähr 340 m ü. d. M. im Kaltwassertal bei Sopron.

Versuchsfläche 20b, 250 m ü. d. M., auf dem sogenannten Varisch bei Sopron gelegen, bestanden mit ungefähr 70 Jahre altem Niederwald von *Quercus sessiliflora*; Bestandsschluß 0,8.

Versuchsfläche 24. Brachliegender Freilandboden (Kontrollfläche). Der Boden aller Versuchsflächen ist Lehmboden, mit etwas Sand gemischt.

Auf Grund der Abbildungen und der Tabellen können wir folgendes feststellen.

Die Versuchsflächen 14 und 15 sind gleichaltrige Fichtenbestände und ihr Boden ist von der gleichen Beschaffenheit. Es ergibt sich nun einwandfrei, daß die Änderungen bzw. die zeitlichen Änderungen des biologischen Aktivitätszustandes des Bodens im allgemeinen von quantitativen Änderungen des R-Faktors (Wassergehalt des Bodens multipliziert mit der Bodentemperatur)[1] entscheidend beeinflußt werden. Auch zwischen dem allgemeinen Verlauf des Mikrobenlebens, ermittelt auf Grund der mit der p_H- und mit der Plattenmethode gewonnenen Werte, besteht eine weitgehende Gleichläufigkeit. Die Ergebnisse sind derart überzeugend, daß man eigentlich dazu keine besonderen Bemerkungen zu machen braucht.

Die Größenordnungen der Verhältniszahlen, die die Unterschiede zwischen der p_H- und Plattenmethode ausdrücken, sind recht variabel. Eine Regelmäßigkeit konnte auf Grund der bisherigen Untersuchungen noch nicht ermittelt werden. Die Grenzen schwanken in den meisten Fällen von rund 3 bis 6. Daß die Aktivitätsgrade der p_H-Methode, die als Kulturmedium den Boden selbst verwendet, größere Mikrobenzahlen ergibt als die mehr künstliche Plattenmethode, wurde oben schon gesagt.

Bei den übrigen beiden Versuchsflächen finden wir ungefähr das gleiche Bild. Die Versuchsfläche 20b ist ein Laubwald. Die quantitative

[1] Um negative R-Werte zu vermeiden, werden die Temperaturgrade um 10 vergrößert.

Entwicklung der Bakterienzahlen und der Aktivitätsgrade weicht hier nicht besonders von der quantitativen Entwicklung der Bakterienzahlen der Fichtenwaldböden ab. Auch die Zusammenhänge mit dem *R*-Faktor sind in gleicher Weise zu erkennen. Kleinere Abweichungen in der dynamischen Entwicklung finden wir auf der Kontrollfläche 24, einem brachliegenden Freilandboden. Diese Abweichungen sind aber derart bedeutungslos, daß sie den allgemeinen Gang nicht zu verschleiern vermögen. Nur darauf möchten wir hinweisen, daß der Verlauf der Kulmination der Aktivitätsgrade in den Fichtenwaldböden etwas mehr ausgeglichen ist als in dem Boden des Laubwaldes. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, daß der Fichtenwaldboden infolge der stärkeren Beschattung den Temperatureinflüssen und auch der Austrocknung nicht so regellos preisgegeben ist wie der Laubwaldboden.

Diese Ergebnisse, die einer Beobachtungszeit von $2^1/_2$ Jahren entsprechen, beweisen daher die Brauchbarkeit der von *Fehér* eingeführten neuen Methode (1, 3). Die Änderungen des Aktivitätsgrades sind viel mehr geeignet, den jeweiligen biologischen Zustand des Bodens zu charakterisieren als die Änderungen der Bakterienzahlen, die als solche nichts Wesentliches auszusagen vermögen.

Um wenigstens orientierungsweise auch die bereits ermittelten quantitativen Grade mit dem *R*-Faktor im Zusammenhang bringen zu können, haben wir auf den untersuchten Versuchsflächen dieses Verhältnis bildlich als Parabelfunktionen dargestellt (siehe Abb. 2, S. 32). Die Parabelkurven wurden konstruiert, indem zunächst die verschiedenen *R*-Werte mit den Intervallen von 10 gruppiert, zu den so gebildeten Gruppen, also zu den Gruppen 200, 210, 220, 230 usw., die zugehörigen Aktivitätsgrade ausgesucht, ihre Mittelwerte gebildet und durch diese die Kurven gelegt wurden. Als Grundlage wurden die Beobachtungen der Jahre 1934—36 benutzt. Die bildliche Darstellung beweist, daß man schon auf Grund dieser wenigen Daten die Parabelfunktionen sehr gut konstruieren kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen stimmen also vollkommen mit denjenigen der früheren überein (4).

Es ist nicht zu vermeiden, daß bei der Konstruktion der Parabelfunktionen eine gewisse Streuung der Punkte zustande kommt. Die Ursache liegt in der Untersuchungstechnik. Die Bodentemperatur wird nämlich als Monatsmittel aus den Tagestemperaturen berechnet, der Wassergehalt dagegen wird nur einmal unmittelbar nach der Probeentnahme bestimmt. Ganz anders ist aber der Fall, wenn wir die Frage experimentell untersuchen, wobei viel genauere Ergebnisse erzielt werden können. Darüber werden wir in einer folgenden Arbeit eingehender berichten.

Die einzelnen Funktionen sind in ihrem Verlauf etwas verschieden. Diese Erscheinung ist in der Eigenart des Bodens begründet, die für jede Bodengattung charakteristisch ist.

Die Möglichkeiten weiteren Ausbaues der Methoden zur Bestimmung des Aktivitätsgrades.

Wenn wir die bisher üblichen Methoden der mikrobiologischen Bodenforschung vergleichend betrachten, so erkennen wir sehr bald ihre Unzulänglichkeit. Diese ist erstens in der Technik der Methode begründet und zweitens darin, daß keine dieser Methoden imstande ist, etwas über die tatsächliche biologische Aktivität des Bodens unabhängig von der Zeit der Untersuchung auszusagen. Man hat meistens mit den Zahlen der Mikroorganismen gearbeitet. Diese Zahlen können indessen nur relativ gewertet werden und bilden keinen Maßstab für die Aktivität des Bodens. Auch ergeben die einzelnen Zählungsmethoden derartige Unterschiede zwischen den Bakterienzahlen, daß man zwischen ihnen eigentlich keinen richtigen ursächlichen Zusammenhang feststellen kann. Daher kann der weitere Fortschritt des methodischen Ausbaues der biologischen Bodenforschung nur dadurch erzielt werden, daß man bestrebt sein muß, nicht die meistens kaum etwas aussagende Zahl, sondern vielmehr die quantitative und qualitative Leistung und Tätigkeit dieser Mikroorganismen zu erfassen.

Aus diesem Grunde ist die von *Fehér* vorgeschlagene p_H-Methode grundverschieden von dem Wesen der übrigen Methoden. Die p_H-Änderungen stellen nämlich eine Endwirkung des gesamten Bodenlebens dar, die durch das komplexe Einwirken aller Mikroorganismen des Bodens auf seinen biochemischen und biophysikalischen Zustand erreicht wird. Die Veränderungen der p_H-Zahlen sind also wenigstens annäherungsweise ein physiko-chemischer, exakter Ausdruck für die Energetik des Bodenlebens. Ihre Bedeutung wird auch dadurch erhellt, daß sie nicht allein die Arbeit der Bakterien, sondern die Arbeit der gesamten Mikrobenbevölkerung des Bodens erfassen. Aber auch mit dieser Methode wird man auf dem bisher eingeschlagenen Wege nur die Veränderungen des biologischen Bodenzustandes auf induktivem Wege, je nach dem Zeitraum, feststellen können. Man kann also immer nur ein Bild der Vergangenheit entwerfen. Es ist klar, daß auch auf Grund dieser Erkenntnis schon gewisse Folgerungen für die Zukunft abgeleitet werden können. Aber auch in diesem Falle sind wir noch immer nicht in der Lage, über den biologischen Energiegehalt oder über die biologische Aktivität eines Bodens in einem beliebigen Zeitpunkt etwas Endgültiges auszusagen.

Die biologische Aktivität des Bodens ist ein Ausdruck seines biologischen Energiegehaltes. Da aber dessen Entfaltung durch die herrschenden Umweltfaktoren beschränkt oder befördert wird, so wird man auf Grund derart gewonnener Ergebnisse nie einen richtigen Ausdruck für den Energiegehalt des Bodens bekommen. Dazu müssen wir einen anderen Weg einschlagen. Um die Grenzen der Energie-

entfaltung des Bodens richtig erfassen und ausdrücken zu können, müssen wir vorerst die optimalen Grenzen der Außenfaktoren kennen, die die optimale Entwicklung des Bodenlebens überhaupt ermöglichen.

Jeder Boden besitzt in seinen sonstigen physikalischen und chemischen Eigenschaften eine gegebene Grundlage, die die Entwicklung der Kleinlebewelt überhaupt ermöglicht. Diese Entwicklung, d. h. die volle Entfaltung der inneren biologischen Energie des Bodens, wird aber erst möglich sein, wenn die übrigen variablen Außenfaktoren sich im Optimum befinden. Von diesen Faktoren sind Wärme und Wassergehalt des Bodens die, welche das ganze Geschehen der mikrobiologischen Lebensvorgänge innerhalb der durch den physiko-chemischen Zustand des Bodens gegebenen Grenzen entscheidend beeinflussen. Durch ihre Schwankungen entstehen alle erdenklichen äußeren biologischen Lebensäußerungen des Bodens. Setzt man also diese beiden im Boden optimal, so ist es klar, daß dadurch die inneren, bereits gegebenen Kräfte des Bodens die völlige Entfaltung seiner biologischen Energie herbeiführen werden. Dazu mußten wir aber erst durch langdauernde Versuche die für das Leben und für die Entwicklung der Mikroorganismen des Bodens charakteristischen optimalen Grenzen der Wärme und Feuchtigkeit ermitteln.

Auf Grund unserer Untersuchungen wissen wir, daß das Optimum des Bodenlebens bei rund 25° C Bodentemperatur und bei ungefähr 25 % Bodenfeuchtigkeit liegt. Auf Grund dieser Erkenntnis können wir jetzt die biologische Aktivität eines Bodens in jedem gegebenen Zeitpunkt bestimmen. Wird nämlich ein Boden, der über eine gewisse Aktivität verfügt, unter optimale Bedingungen gebracht, so wird er natürlich in einer gewissen Zeit seine Lebensenergie voll entfalten können. Bringen wir daher eine Bodenprobe im Laboratorium unter optimale Feuchtigkeits- und Temperaturverhältnisse, so können wir nach Ablauf einer gewissen Beobachtungszeit, die zur vollen Entwicklung der inneren biologischen Kräfte des Bodens notwendig ist, ihn auf seinen tatsächlichen Aktivitätsgrad untersuchen.

Diese optimalen Bedingungen sind aber in der Natur fast nie vorhanden. Es würde ein ganz seltener Zufall sein, daß in einem Wald- oder Ackerboden diese gunstige Konstellation der beiden Faktoren zustande kommt. Es ist viel wahrscheinlicher, daß auch in der Hauptvegetationszeit, in der das biologische Verhalten der Böden uns am meisten interessiert, ganz andere und abweichende Bedingungen vorherrschen. Nun wissen wir aber wenigstens in großen Zügen, in welcher Weise die beiden regulativen Faktoren: Wärme und Feuchtigkeit, im komplexen Sinne, das Bodenleben beeinflussen. Auf Grund unserer Untersuchungen wissen wir, daß man diesen Einfluß am besten so zum Ausdruck bringen kann, daß man die zahlenmäßigen Werte dieser beiden Faktoren mit-

einander multipliziert und einen Ausdruck bildet, der empirisch und rein zahlenmäßig die Wirkung dieser Faktoren ausdrückt. Diesen Faktor bezeichnen wir mit dem Buchstaben R.

Andererseits wissen wir ebenfalls auf Grund langjähriger Untersuchungen, wie der Faktor R die quantitative Entwicklung des Bodenlebens beeinflußt, daß nämlich zwischen den Änderungen der R-Werte und denen der Mikroorganismen ein Verhältnis besteht, das man am besten durch eine Parabelfunktion ausdrücken kann. Durch diese weitere Erkenntnis wird uns die Möglichkeit geboten, die verschiedenen R-Werte im Laboratorium künstlich herzustellen und unter diesen Bedingungen die fraglichen Bodenproben auf ihre Aktivität zu untersuchen. Das wichtigste ist dabei, daß die genaue Kenntnis dieses Zusammenhanges uns zeigt, daß weder die Temperatur, noch die Feuchtigkeit, falls sie ihre Optimumgrenzen nicht überschreiten, einseitig das Bodenleben beeinflussen können. Es ist viel mehr ihr komplexes Zusammenwirken der Hauptfaktor, der regulierend wirkt. Dadurch wird uns natürlich die Möglichkeit geboten, innerhalb der angegebenen Optimumsgrenzen die Werte von R derart zusammenstellen zu können, daß eine Konstruktion der Parabelfunktion ermöglicht wird. Da jede Bodengattung im Augenblick der Probeentnahme in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften eine konstante innere Energie enthält, so ist es klar, daß man zunächst diese Parabelfunktion konstruieren muß, um dadurch die Aktivität des zu untersuchenden Bodens für die in der Natur später vorkommenden R-Werte wenigstens annäherungsweise ausdrücken zu können.

Durch diese Überlegungen sind wir nun insoweit weitergekommen, daß es uns wahrscheinlich durch den Ausbau der diesbezüglichen Methodik möglich sein wird, den biologischen Energiegehalt eines Bodens auf Grund der exakt physiko-chemischen Messungen seiner biologischen Zustandsänderungen in einem jeden Zeitpunkt unabhängig von der unbestimmten Variabilität der herrschenden Naturkräfte bestimmen und auch wenigstens annäherungsweise voraussagen zu können.

Um das bis jetzt Gesagte kurz zusammenfassen zu können, möchten wir zunächst noch folgendes theoretisch feststellen:

Wenn man den Aktivitätsgrad des Bodens im Augenblick der Entnahme der Bodenproben mit A_t bezeichnet und unter A den Aktivitätsgrad versteht, der unter optimalen Bedingungen erreicht werden kann, so müssen wir unter dem Ausdruck $A_l = A - A_t$ die latente Aktivität des Bodens (A_l) verstehen, die infolge der Unzulänglichkeit der in dem gegebenen Zeitpunkt herrschenden Außenfaktoren nicht zustande kommen kann.

Wir dürfen aber nicht vergessen, daß der Ausdruck A schon eine Größe bedeutet, die auch von dem jeweiligen physiko-chemischen

Zustand des Bodens, also von dem organischen und anorganischen Nährstoffvorrat und von den physikalischen Eigenschaften usw., entscheidend beeinflußt wird. Diesen Ausdruck werden wir am besten dadurch analysieren können, daß wir die biologisch-energetische Kraftentfaltungsmöglichkeit des Bodens (Atmung, Zersetzung usw.) der Bodenmikroflora mit M bezeichnen, die physiko-chemischen Eigenschaften, die eigentlich die innere Grundlage für das Mikrobenleben abgeben, in ihrer Gesamtheit mit dem Buchstaben η ausdrücken und für jede Bodengattung in dem Zeitpunkt der Probeentnahme als charakteristisch und konstant betrachten, da diese von den regulativen Außenfaktoren: Wärme und Feuchtigkeit unmittelbar nicht beeinflußt werden kann. Infolgedessen wird

$$A = \eta \, . \, M.$$

Auf Grund des jetzt Gesagten möchten wir für den allgemeinen Gang der Untersuchung auf Grund unserer bisherigen Vorversuche folgenden Weg vorschlagen:

1. Es wird zunächst für die zu untersuchende Bodengattung nach der Bestimmung des Humusgehaltes und ihrer wichtigsten biophysikalischen Eigenschaften die Zeit ermittelt, die für die optimale Entwicklung der Bodenmikroflora je nach den verschiedenen Jahreszeiten notwendig ist. Es wird also eine Anzahl von Proben des gleichen Bodens zunächst auf 25% Feuchtigkeitsgehalt gebracht, sodann im Thermostaten (25° C) gehalten und in gleichen Zeitintervallen untersucht, bis der Höhepunkt der quantitativen Entwicklung der Mikroorganismen erreicht wird.

2. Nach der Ermittlung dieser Zeit werden die verschiedenen Werte von R, die zur Konstruierung der Parabelfunktion notwendig sind, künstlich hergestellt, am besten durch Variation des Feuchtigkeitsgehaltes bei konstanter Temperatur, wodurch der Gang der Analyse wesentlich vereinfacht wird. Sodann wird die Bodenprobe bei konstanter Temperatur auf die vorher berechneten Stufen des Feuchtigkeitsgehaltes gebracht, die Zeit hindurch, die in 1. ermittelt wurde, im Thermostaten gehalten und endlich auf ihren Aktivitätsgrad mit der p_H-Methode untersucht. Um auch die Werte von A_t berechnen zu können, wird ein Teil der Bodenproben gleich nach der Entnahme mikrobiologisch mit Hilfe der p_H-Methode analysiert.

Es versteht sich von selbst, daß die Untersuchung für diese R-Werte erfolgt, die in der Hauptvegetationszeit, also im Spätfrühling und im Sommer, vorzukommen pflegen. Man ermittelt also immer den R-Wert des optimalen Feuchtigkeits- und Temperaturgrades und dann vier bis fünf Werte von R, möglichst in gleichen Abständen und innerhalb der Optimumgrenzen von Temperatur und Feuchtigkeit, die in der Vegetationszeit gewöhnlich vorkommen. Ist dann einmal die Parabelfunktion konstruiert, so wird man auch die den anderen Werten von R entsprechenden Punkte der quantita-

tiven Entwicklung der Mikroflora wenigstens annäherungsweise bestimmen können.

Bei der Herstellung der R-Werte muß man natürlich Temperaturgrade wählen, die zwischen den entsprechenden Optimumgrenzen liegen. Dies gilt auch für die Herstellung der Feuchtigkeitsgrade. In allen Fällen müssen wir vermeiden, daß infolge von zu niedrigen oder von zu hohen Werten dieser Faktoren eine begrenzende Wirkung eintritt, die dann den dynamischen Verlauf der ganzen Erscheinung verschleiert.

Ausdrücklich ist zu betonen, daß die exakte Ermittlung des Zeitpunktes, bei dem die optimale Entwicklung der Mikroorganismen oder besser gesagt ihrer Arbeitsleistung erfolgt, von grundlegender Bedeutung ist. Nach diesem Zeitpunkt wird nämlich infolge der langsamen Abnahme des organischen Nahrungsvorrates dieser als begrenzender Faktor wirken und die weitere quantitative Entwicklung und Arbeit der Mikroorganismen seinerseits ungünstig beeinflussen. In der freien Natur wird nämlich unter den fallweise gegebenen Umständen ein gewisser Ersatz aus den noch nicht vollständig verarbeiteten organischen Abfallresten des Bodens bis zu einer gewissen Grenze möglich sein. Auch die Stoffwanderung nach der Tiefe spielt hier eine nicht unerhebliche Rolle.

Bei der Untersuchung im Laboratorium, wo die Bodenproben aus ihrer natürlichen Lagerung entfernt und aus ihrem Zusammenhang mit dem vitalen Stoffkreislauf des Bodens befreit sind, wird natürlich ein Ersatz nicht mehr möglich sein. Daher ist die Bestimmung des Zeitpunktes der optimalen Lebensentwicklung der Mikroorganismen für die Durchführung dieser Untersuchungen von ausschlaggebender Bedeutung. Es muß auch berücksichtigt werden, daß dieser Zeitpunkt der optimalen Entwicklung auch von der Größe der latenten Aktivität abhängt. Im Winter, wo die Werte von A_l am größten sind, wird der Boden für seine optimale Energieentfaltung mehr Zeit beanspruchen als im Sommer, wo die Werte von A_l am geringsten werden.

Auch die Wirkung der verschiedenen Werte von R auf den Zeitfaktor muß noch experimentell erforscht werden.

Auch welche organische und anorganische Faktoren dann außer dem Humusgehalt und den wichtigsten physikalischen Eigenschaften des Bodens (Luftkapazität, Wasserkapazität, Porosität) noch für die quantitative Charakterisierung von η berücksichtigt werden sollten, müssen weitere Untersuchungen entscheiden. In einer folgenden Mitteilung werden wir über unsere bisherigen Ergebnisse berichten.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß zwischen R-Wert des Bodens (Temperatur × Feuchtigkeit) und seinem Mikroorganismenleben eine unmittelbare Beziehung besteht.

Besser als durch Zählung der Bakterien wird der biologische Zustand des Bodens durch seinen Aktivitätsgrad gekennzeichnet, der angibt, bei welcher Verdünnung der Bodenaufschwemmung in dem gleichen, vorher sterilisierten Boden noch biologisch bedingte Veränderungen eintreten. Als Maßstab dienen die Veränderungen des p_H-Wertes, die man bestimmt.

Es wird ein neuer Weg vorgeschlagen, der erlaubt, nicht nur den augenblicklichen Aktivitätsgrad des Bodens zu erfassen, sondern auch seine maximale biologische Leistungsfähigkeit zu ermitteln.

Literatur.

1) *D. Fehér*, diese Zeitschr. 8, 362, 1932. — 2) *Derselbe*, ebenda 8, 609, 1932; II. Mitteilung: 5, 402, 1934. — 3) *Derselbe*, ebenda 4, 257, 1933. — 4) *Derselbe*, ebenda 4, 447, 1933. — 5) *Derselbe*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkde. 44, 341, 1936. — 6) *A. Rippel*, Der Forschungsdienst 1, 28, 1935. — 7) *I. Demeter*, Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. XII, Teil 2, H. 6, S. 771 u. f., Wien 1936. — 8) *S. A. Waksman*, Annual Review of Biochemistry 5, 561, 1936. — Die letzten drei Arbeiten enthalten die neuesten Literaturangaben.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

Über Eiweißbildung durch Bakterien.

I. Mitteilung:

Erfahrungen bei der Herstellung einer synthetischen Nährlösung mit Glykokoll als Stickstoffquelle.

Von

August Rippel,

unter Mitwirkung von **Brigitte Lehmann** †[1].

(Eingegangen am 16. Januar 1937.)

Das Ziel dieser und weiterer geplanter Untersuchungen ist ein doppeltes: Einmal sollte festgestellt werden, wieweit Bakterien aus den Verdauungsorganen des Rindes imstande sind, einfache Stickstoffverbindungen zum Aufbau von Eiweiß zu verwenden; es sollten sich daraus Gesichtspunkte ergeben für die mögliche Beteiligung von Mikroorganismen an einem Eiweißaufbau aus Stickstoffverbindungen nichteiweißartiger Natur in den Verdauungsorganen der Wiederkäuer. Dabei soll hier nicht die Frage erörtert werden, ob ein solcher Aufbau überhaupt in nennenswertem Maße stattfindet, und zutreffendenfalls, ob er unter Beteiligung von Mikroorganismen oder ausschließlich durch solche erfolgt.

Sodann kam als weiterer Gesichtspunkt die Eiweißbildung durch Mikroorganismen überhaupt hinzu, die namentlich da von besonderem Interesse ist, wo es sich um Mikroorganismen handelt, denen anorganische Stickstoffverbindungen nicht ohne weiteres leicht zugänglich sind, eine Frage, die bisher, in Hinsicht auf eine mögliche praktische Verwertbarkeit, fast ausschließlich an *Hefe* untersucht wurde.

Die rein praktischen Gesichtspunkte sollen indessen hier zurücktreten; es sollen vielmehr lediglich die Grundlagen der Eiweißbildung uberhaupt untersucht werden. Nur insoweit waren praktische Gesichtspunkte maßgebend, als versucht werden sollte, eine möglichst quantitative Umsetzung der Stickstoffverbindungen zu erzielen, und zwar bei Konzentrationen, die annähernd den Verhältnissen im Tierkörper entsprechen würden (vgl. S. 48f).

Eine vorläufige Beschränkung erhielt der Arbeitsplan dadurch, daß zunächst nur mit der einfachsten Aminosäure, dem Glykokoll, das in neuerer Zeit auf Ersatz des Futtereiweißes bei Wiederkäuern geprüft ist, und weiterhin auch nur mit einem Bakterium gearbeitet wurde. Die gewonnenen Gesichtspunkte sollen künftig auf andere Stickstoff-

[1] Am 24. Februar 1937 verstarb meine treue Mitarbeiterin.

verbindungen und Mikroorganismen angewendet, bzw. es sollen auftretende Verschiedenheiten auf ihre Ursachen untersucht werden. Daß die zunächst vorgenommene Beschränkung richtig war, zeigen die bei Herstellung einer synthetischen Nährlösung bei nur einem Organismus auftretenden Schwierigkeiten, die im folgenden geschildert werden; sie lagen hauptsächlich in den gestellten quantitativen Forderungen. Insbesondere soll später noch festgestellt werden, wieweit das isolierte Bakterium zur normal vorhandenen Darmflora gehört, und wie sich weiter zu isolierende Mikroorganismen verhalten.

Das zu den Versuchen verwendete Bakterium, Bacillus glycinophilus nov. spec.[1]

Da sich erst im Verlaufe der Untersuchungen die geeignete Zusammensetzung der Nährlösung ergab, so wurde die Anreicherung zur Isolierung eines Bakteriums, das Glykokoll als Stickstoffquelle verwertet, in einer anders zusammengesetzten Nährlösung vorgenommen, wobei zunächst das Glykokoll auch als Kohlenstoffquelle diente (vgl. hierzu aber S. 43f.). Aus einem frisch geschlachteten Ochsen wurden möglichst steril Proben aus Dünn- und Dickdarm (der Pansen ist hier nicht berücksichtigt) entnommen und eine Platinöse davon in eine Glykokollnährlösung folgender Zusammensetzung gebracht: Glykokoll 0,5 %, K_2HPO_4 0,1 %, $MgSO_4$ 0,02 %, NaCl, Leitungswasser; Bebrütung bei 37° C. Nach 6 Tagen, als schwache Bakterienentwicklung eingetreten war, wurde in gleiche Nährlösung weitergeimpft, und davon wurden nach weiteren 4 Tagen Platten gegossen von gleicher Zusammensetzung + 1 % Agar. Von den auftretenden Kolonien wurde nach 6 Tagen auf Bouillon-Schrägröhrchen abgeimpft. Die Bakterien wuchsen gut. Als endgültiger Stamm wurde eine Isolierung aus Dickdarm genommen, und zwar ein Stamm „rund".

Etwa 1$^1/_2$ Jahre nach der Isolierung namlich wurde die Reinheit der Kulturen überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß auf Platten zwei etwas verschiedenartige Kolonien auftraten, die nach der Kolonieform als „rund" und „flach" bezeichnet sind. „Stamm rund" hatte runde (kreisförmige), gewölbte, auf Agar bräunliche Kolonien. Beim Abimpfen unter Vergrößerung mit der Mikropipette zeigten sie sich deutlich von einem Häutchen umgeben. „Stamm flach" hatte lappige Kolonien, die sich bald über die ganze Agaroberfläche verbreiteten. Er war stärker und länger beweglich als der „Stamm rund". An allen übrigen Merkmalen verhielten sich die beiden Stämme jedoch gleich, so daß es sich zweifellos nicht um verschiedene Arten handelt, sondern um Varianten wohl nach Art von „Glatt-" und „Rauhformen". Gearbeitet wurde stets mit Stamm „rund", wenn nicht anders angegeben ist (vgl. S. 56 und 57). Alle Beobachtungen, einschließlich der Glykokollverarbeitung, wurden an Einsporkulturen (Isolierung mit dem Mikromanipulator) nachgeprüft.

Das Bakterium, das hier vorläufig kurz beschrieben werden soll, ist ein Sporenbildner, der mit keinem der sporenbildenden Erdbakterien zu identifizieren war. Die Stäbchen messen (auf Bouillon und auf ein Drittel Dextroseagar, wie ihn *Heigener* verwendete) 4 bis 6, durchschnittlich 5,08 μ in der

---

[1] Für die freundliche Unterstützung bei der morphologischen Untersuchung des Bakteriums danke ich auch an dieser Stelle Frl. Dr. *Pietschmann* bestens.

Länge, 0,9 μ in der Breite. Die Sporengröße ist 1,5 bis 2,5 μ, durchschnittlich 2,25 × 1 μ. Die Sporen sind zylindrisch. Vergleichsweise wurden für *Bacillus subtilis* gemessen: Stäbchen 3,4 × 0,8 bis 0,9 μ, Sporen 1,5 bis 1,75 × 1 μ. Die Sporenmutterzelle ist stäbchenförmig, nur bisweilen schwach bauchig. Die Spore steht dem einen Ende genähert, bisweilen median.

Das Bakterium ist lebhaft beweglich, stellt aber bei starker Beleuchtung die Bewegung bald ein; Vorschalten eines Rotfilters ermöglicht längere Beobachtung. Die Geißeln sind am lebenden Bakterium im Dunkelfeld nicht sichtbar zu machen, auch nicht beim Einbringen in Gummilösung, nur hin und wieder erscheinen sie hier an absterbenden Individuen. Die Geißelfärbung (nach *Levensen*; vorher noch 1 Minute Fixierung mit Osmiumdämpfen; diese Methode erwies sich als besser als die von *Löffler* oder *Zettnow*) ergab anscheinend *polare* Begeißelung. Doch stehen die Geißeln nicht ganz endständig, sondern sind ein wenig unterhalb an der Langseite des Stäbchens inseriert. Es erschienen genügend Bilder, die bei flüchtiger Betrachtung peritriche Begeißelung vortäuschten; genaues Durchmustern zeigte indessen, daß die Geißeln eindeutig um den Bakterienkörper herumgeschlagen waren, und daß im übrigen der Ansatz wie oben geschildert war. Auf die weitere Erörterung dieser Erscheinung, die für sporenbildende Bakterien ein Novum darstellen würde, möchte ich mich hier indessen nicht einlassen, zumal immer noch die Möglichkeit vorliegt, daß die median inserierten Geißeln leichter abreißen als die polar inserierten

Erwähnt sei noch, daß die Geißeln außerordentlich empfindlich sind und durch das Antrocknen infolge der auftretenden Spannungen sehr leicht losreißen, was man durch Verwendung sehr dünner Ausstriche mit schnellem Antrocknen etwas mildern kann. Ferner scheint das Losreißen durch Suspension der Bakterien in Gummilösung (5 bis 20 %) gemildert zu sein. Das hat weiter den Vorteil, daß dabei nicht die störenden Niederschläge auftreten, die in Bouillonpräparaten erscheinen.

Als Inhaltstoff wurde auf ein Drittel Dextroseagar (s. oben) sowie in Bouillon lediglich Glykogen gefunden, kein Volutin und kein Fett. Jedoch zeigten die Bakterien aus dem Bodensatz einer älteren flüssigen Bouillonkultur Fett, was offenbar als degenerative Verfettung anzusehen ist. Hier fanden sich auch nur vereinzelt Sporen.

Die Gramfärbung ist negativ; die Bakterien entfärben sich in weniger als $^1/_2$ Minute. Bei der Sporenanlage wird die Gramfärbung labiler.

Auf steriler Kartoffelscheibe gutes Wachstum mit glänzendem, bräunlichem, nicht allzu dickem Belag. Gasbildung in Dextrosebouillon fehlt. Wachstum gut bei 37° C, Optimum bei 40 bis 45° C. Auf flüssiger Bouillon eine weißliche, verhältnismäßig leicht zerreißliche und dann in Fetzen absinkende Kahmhaut.

Literaturübersicht.

Obwohl die Frage der Eignung einzelner Aminosäuren für die Eiweißsynthese durch Mikroorganismen viel behandelt worden ist, liegen doch, namentlich für Bakterien, nur wenige quantitative Angaben vor. Wir beschränken uns hier im allgemeinen auf das Glykokoll. In den meisten Fällen wird lediglich angegeben, ob das Wachstum besser oder schlechter war; nur bei Pilzen findet sich häufiger die Angabe der Mycelernte. Zudem wird die Frage der Glykokoll- bzw. Aminosäureverarbeitung meist verknüpft mit der Frage nach der Eignung als

einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. So wichtig das auch, namentlich in Hinsicht auf den Chemismus des Aminosäureabbaues, ist, so ist diese Frage doch vom ökonomischen Standpunkt aus belanglos.

Denn die Eignung als Kohlenstoffquelle ist nicht nur abhängig von der chemischen Natur der betreffenden Verbindung, sondern auch von dem Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis darin. Da Glykokoll 18,7 % Stickstoff enthält, so würden 100 g Glykokoll nur dann restlos in Eiweiß überführt werden können, wenn daneben noch 17 g Zucker vorhanden wären (100 + 17 = 117 g mit 18,7 g N = 16 %). Hierbei sind aber weder stickstofffreie Körpersubstanzen berücksichtigt noch Atmungsmaterial. Unter allen Umständen muß also die Ausnutzung des Glykokolls erheblich besser sein, wenn eine besondere Kohlenstoffquelle zugegen ist. Fehlt diese, so kann nur das Kohlenstoffskelett des Glykokolls selbst als Bau- und Atmungsmaterial dienen; die Hauptmenge des Stickstoffs bleibt ungenutzt und erscheint gegebenenfalls als Ammoniak, dessen Anhäufung allein schon die weitere Verarbeitung zum Stillstand bringen kann, so daß unter Umständen aus diesem Grunde nicht einmal der Kohlenstoff des Glykokolls voll ausgenutzt würde. Unterschiede von Mikroorganismen bei Glykokoll als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle besagen also zunächst nichts in Hinsicht auf eine bessere oder schlechtere Verwertbarkeit als reine Stickstoffquelle, da sekundäre Erscheinungen hinzukommen können. Obwohl das Gesagte selbstverständlich ist, muß doch an dieser Stelle, wo es sich um quantitative Feststellungen handelt, darauf hingewiesen werden, zumal in der Literatur diese Dinge meist nicht scharf genug betont werden. Hier ist im allgemeinen nur die Literatur über Glykokoll als Stickstoffquelle berücksichtigt; im übrigen vergleiche man *Heigener*.

Für *Pilze* ist Glykokoll im allgemeinen eine ausgezeichnete Stickstoffquelle (*Ascomycetes* bzw. *Fungi imperfecti*, *Mucorineae*), wie zahlreiche Untersuchungen gezeigt haben. Zu der bei *Czapek* (S. 164/165) angeführten Literatur sei noch auf *Hochapfel*, ferner *Waksman* und *Lomanitz* sowie *Anderson* und *Emmart* verwiesen. Nach *Zaleski* und *Pjukow* verbraucht allerdings *Aspergillus niger* in Gegenwart von Ammoniumlactat kein Glykokoll, wohl aber in Gegenwart von Ammonsulfat, dann jedoch weniger als von diesem. Nach *Abderhalden* und *Rona* enthielt *Aspergillus niger*, auf Glykokoll aufgewachsen, qualitativ die gleichen Aminosäuren wie bei Wachstum auf Nitrat als N-Quelle.

Auch *Hefen* konnen Glykokoll verarbeiten (*Czapek*, S. 161/162). Nach *Pirchle* war die Verwertung allerdings schlechter als die von Ammonsulfat und entsprach etwa der des Nitrats. Auch *Wagner* fand recht schlechte Verwertung bei Preßhefeerzeugung. *Nielsen* stellte endlich fest, daß für die Verarbeitung von Aminosauren durch *Hefe* Wuchsstoffe notwendig sind.

Für *Actinomycetes* liegt eine Angabe von *Waksman* und *Lomanitz* vor, wonach Glykokoll verwertet wird; die N-Aufnahme wurde hier auch quantitativ bestimmt.

Für *Bakterien* finden sich zahlreiche Angaben; jedoch ist mir nur eine quantitative von *Waksman* und *Lomanitz* bekannt, wonach *Pseudomonas*

fluorescens in 9 Tagen eine Ausbeute von 10,3 $^0/_0$ des Glykokollstickstoffs ergab; es wurde allerdings eine Nährlösung mit der hohen Glykokollgabe von 1 % verwendet. Die *Fluorescens*-Gruppe scheint Glykokoll besonders gut anzugreifen, wie sich aus den qualitativen Angaben von *den Dooren de Jong* ergibt. Für *Ps. pyocyaneus* vergleiche man noch *Supniewski*; bei diesem Organismus fand *Acklin* allerdings keine Verwertung.

Auch sonst sind die Verhältnisse bei den Bakterien wenig durchsichtig. Einmal erlauben die nur qualitativen Angaben kein sicheres Urteil. Immerhin geht jedoch aus den Versuchen von *Stapp* sowie *Heigener* ein bemerkenswerter Unterschied zwischen verschiedenen erdbewohnenden Sporenbildnern hervor, allerdings in der Ausnutzung des Glykokolls als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, so daß der oben erwähnte Übelstand in Erscheinung treten konnte. Sodann aber kann nicht festgestellt werden, wieweit die Zusammensetzung der Nährlösung für die jeweiligen Bakterien optimal war. Aus den unten S. 56f. mitgeteilten Versuchen geht die Bedeutung dieses Umstandes hervor. Auch Stämme der gleichen Art können sich auf gleicher Nährlösung verschieden verhalten. *Kondo* berichtet beispielsweise, daß die einzelnen Stamme von *Mycobacterium tuberculosis*, Typus *humanus* und *bovinus*, bei Acetat als Kohlenstoffquelle teilweise wuchsen, wenn auch sehr langsam, teilweise jedoch nicht. Ähnliches geht aus Angaben von *Braun* und Mitarbeitern über *Bacillus typhi* und *M. tuberculosis* hervor.

Für *Propionsäurebakterien (Propionibacterium Zeae)* geben *Fromageot* und *Piret* schlechte Verwertung von Glykokoll an, während Ammoniak viel besser verwertet wurde. Aber Wachstum trat mit Glykokoll als Stickstoffquelle (Trübungsmessung!) nur in Gegenwart von Mais-(Polenta-) Extrakt auf.

Aus den Angaben von *Orla-Jensen* über *Milchsäurebakterien*, wobei nur mit Gemischen von Stickstoffquellen gearbeitet wurde, läßt sich für unsere Zwecke nicht viel entnehmen. Der Verfasser geht von dem Grundsatz aus, einzelne Aminosauren zu ersetzen, um festzustellen, ob sie notwendig seien, und steht im übrigen auf dem Standpunkt, daß „diese einfachen Aminosäuren keine physiologische Bedeutung für die *Milchsäurebakterien* haben“, womit natürlich die Fragestellung auch ganz anderer Art ist als die unserige.

Für *Azotobacter* fand *Thompson* Glykokoll (0,1 $^0/_0$) ungeeignet und spricht von toxischer Wirkung. Aus den unten S. 56 angeführten Versuchen geht indessen eine gewisse Verwertbarkeit hervor. Über weitere Angaben für Bakterien vergleiche man *Heigener*.

Von Besonderheiten sei noch erwahnt, daß *Glincka-Tchernorutzky* besseres Wachstum von *Bacillus mycoides* auf Glykokollnährlösung erzielte, wenn er zu 0,1 $^0/_0$ K_2HPO_4 in der Nährlosung noch 0,1 $^0/_0$ hinzufügte, was etwas in der Richtung eigener Feststellungen (unten S. 50) liegt.

Jedenfalls ergibt sich aus allen diesen Beobachtungen, in Verbindung mit den unten zu schildernden eigenen Ergebnissen, daß unbedingt systematisch nach einer für den jeweiligen Organismus geeigneten Nährlösung gesucht werden muß, bevor man endgültig über die Verwertung des Glykokolls urteilen kann. Wie schon gesagt, wurde von den bisherigen Versuchsanstellern stets nur eine einheitliche Nährlösung benutzt, und vor allem wurde niemals die Wirkung der einzelnen Bestandteile der Nährlösung eingehend geprüft, von den letzterwähnten kurzen Angaben abgesehen.

Aber die Frage der Verarbeitung des Glykokolls und der Aminosäuren überhaupt hat noch eine andere Seite. Man fragt im allgemeinen lediglich nach der Nährstoffwirkung an sich und berücksichtigt zu wenig die Möglichkeit sonstiger Wirkungen der Aminosäuren, die in Betracht kommen könnten. Nur in der medizinischen bzw. tierphysiologischen Literatur tritt der Begriff der spezifisch dynamischen Wirkung der Aminosäuren auf (s. unten). Eine Durchsicht der Literatur zeigt nun dreierlei Erscheinungen:

Einmal ist festgestellt, daß Aminosäuren stark atmungshemmend auf Mikroorganismen wirken. *Boltjes* konnte zeigen, daß die Giftwirkung von organischen Stoffen, insbesondere von Pepton, auf Nitrit- und Nitratbildner, auf der erwähnten Eigenschaft der Aminosäuren beruht, die schon vor ihm *Meyerhof*[1] gezeigt hatte. Ich lasse hier dahingestellt, ob es sich um eine Wirkung handelt, die auf bestimmte Mikroorganismentypen beschränkt ist. Ebenso muß dahingestellt bleiben, ob diese Giftwirkung auf die Komplexbildung der Aminosäuren mit Metallen (vgl. unten S. 47) zurückzuführen ist. Es ist indessen nicht ganz einzusehen, daß diese sich nicht ebenso wie bei anderen Metallkomplexbildnern (Blausäure) auswirken sollte. Es kann jedoch vorläufig noch nicht weiter darauf eingegangen werden[1]. Nach *Webster* verhindert jedenfalls Kaliumcyanid die Oxydation von Aminosäuren durch *Ps. pyocyaneus*, zu der offenbar Gegenwart von Eisen erforderlich sei.

Andererseits aber wirken Aminosäuren stark atmungsfördernd, wie z. B. *Schwabe* (dort auch weitere tierphysiologische Literatur) für submerse Pflanzen zeigte. Beide Feststellungen lassen sich im Augenblick schwer vereinigen. *Meyerhof* indes, der durch Aminosäuren bei der tierischen Leber Atmungssteigerung fand, nicht aber beim tierischen Muskel, weist darauf hin, daß die Steigerung mit Desaminierungsvorgängen zusammenhängen könne und dann möglicherweise nichts anderes sei als die Atmungssteigerung durch Milch- oder Brenztraubensäure über die Kohlenhydratsynthese (spezifisch-dynamische Wirkung der Aminosäuren). Beim Fehlen der Atmungssteigerung im tierischen Muskel fehlte nämlich auch die Ammoniakbildung.

Drittens sei noch auf die Erscheinung der Chemodinese hingewiesen, wie sie durch Aminosäuren ausgelöst wird (*Fitting*, vgl. ferner *Hammett*).

Eines geht jedenfalls aus diesen Betrachtungen hervor, daß im Falle der Nichtverwertbarkeit von Glykokoll, wie auch von anderen Aminosäuren, nicht ohne weiteres die einfache Formel aufgestellt werden kann: Der Organismus vermag einfache Aminosäuren nicht zur Eiweißsynthese zu verwenden. Denn die Ursachen des Nichterfolges können ganz andere sein wie solche des bloßen Stickstoff-Stoffwechsels.

Von weiteren Besonderheiten sei noch erwähnt, daß nach *Ochmann* Aminosäuren einen ganz verschiedenen Einfluß auf die Sporenbildung von *Hefen* hatten. Besonders auffallend ist, daß Glykokoll die Sporenbildung von *Schizosaccharomyces Pombe* außerordentlich förderte (12,6% Sporen,

[1] Vielleicht handelt es sich bei dem von *Kořínek* und *Babička* beobachteten Heraustreten von Stoffen aus abgekochten Bakterien, die Kupferionen in komplexe Form überführen, um eine Wirkung von Aminosäuren.

während sonst der höchste Wert 6,6 betrug); bei anderen Hefen war diese Glykokollwirkung aber nicht vorhanden.

Lieben stellte bei fehlendem Zuckerzusatz geringere Kohlensäureentwicklung sauerstoffgeschüttelter Hefe bei Glykokollzusatz und geringen Glykokollverbrauch fest bzw. keinen Einfluß, wenn man die Zahlen als innerhalb der Fehlergrenze liegend ansieht. *Lieben* und *Bauminger* erhielten nur unter bestimmten Bedingungen bei Zuckergegenwart Erhöhung der CO_2-Bildung, sonst war kein Einfluß von Glykokoll zu beobachten (vgl. weiter *Lieben* und *Molnar* über die Wirkung von Glykokoll auf Acetaldehyd- und Alkohol-Verarbeitung durch Hefe). *Meyerhof* (2) fand keinen Einfluß des Glykokolls auf die Atmung, *Zeller* keinen auf die Gärung der *Hefe*; *Nicolai* stellte bei *B. coli* und Glykokoll als Nährsubstrat nur ein Viertel der Atmungsgröße bei Glucose fest, in Gegenwart von Glucose aber Atmungssteigerung durch Glykokoll. Nach *Puriewitsch* war das Verhältnis ausgeschiedene Kohlensäure/Trockensubstanz bei *Aspergillus niger* und Glykokollernährung (ebenso bei anderen Aminosäuren) besonders gering. *Anderson* und *Emmart* fanden für *Fusarium oxysporum* keine Atmungssteigerung durch Aminosäuren, eher eine Hemmung.

Es erscheint jedoch unmöglich bzw. verfrüht, alle erwähnten Beobachtungen unter einheitlichen Gesichtspunkten zu betrachten, da, wie gesagt, die Aminosäuren Wirkungen offenbar ganz verschiedener Natur entfalten können.

Methodik der Eiweißbestimmung.

Gemäß dem Zweck der Arbeit wurde in den Kulturen stets das gebildete Eiweiß bestimmt, und zwar nach der Methode von *Barnstein*, womit natürlich auch die Wachstumsgröße der Bakterien erfaßt ist. Die Kulturlösungen wurden, soweit sie durch Ammoniakbildung alkalisch waren, vor der Eiweißfällung mit Säure neutralisiert. Beim Arbeiten mit Aminosäuren können bei Verwendung der *Barnstein*-Methode Schwierigkeiten auftreten, die darin begründet sind, daß Aminosäuren mit Kupfer Komplexverbindungen ergeben, was schon an der tiefblauen Farbe, wie bei der Kupfer-Ammoniak-Komplexverbindung, zu sehen ist. Beim Vorhandensein größerer Mengen von Aminosäuren können so Fehler entstehen dadurch, daß nicht mehr genügend Kupfer zur Eiweißfällung übrig bleibt, wie Tabelle I an einigen Zahlen zeigt. Bei größeren Glykokollmengen muß also die Kupfersulfatmenge vergrößert werden, selbstverständlich unter entsprechender Erhöhung der Laugenmenge. Eine Adsorption des Glykokolls durch den

Tabelle I.

Material	mg Eiweiß-stickstoff	Fällungsmittel
1 g getrocknete, junge Haferblätter	29,3	Je 25 ccm
Ebenso + 1 g Glykokoll	24,2	Fällungsmittel
50 ccm Bouillon + 50 mg Glykokoll	21,67	25 ccm
50 „ „ + 50 „ „	22,03	50 „
50 „ „ (anderer Herstellung)	13,6	25 „
50 „ „ + 500 mg Glykokoll	0,84	25 „
50 „ „ + 500 „ „	10,9	60 „
50 „ „ + 500 „ „	14,6	100 „

Kupferniederschlag kann dabei etwas störend wirken, hält sich jedoch in mäßigen Grenzen. Wir fanden z. B. in reinen Glykokollnährlösungen mit 100 mg Glykokoll, bei Gegenwart von 0,1 % Agar, in dem Niederschlag von 60 ccm Kupfersulfat 0,70 mg Stickstoff gegenüber 0,42 mg bei 25 ccm Kupfersulfat. In Gegenwart von 25 mg Glykokoll waren die Zahlen jeweils 0,14 mg Stickstoff.

Da wir jedoch bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen stets nur 50 ccm einer 0,1 %igen Glykokollnährlösung benutzten, so haben wir mit dem besprochenen Fehler nicht zu rechnen. Wir erwähnen die Beobachtung, um andere vor der gleichen Erfahrung zu bewahren. So hatten wir z. B. anfänglich bei orientierenden Versuchen angenommen, daß 1 % Glykokoll, zu Bouillon zugesetzt, die Bakterien schon etwas schädige, nicht dagegen in verdünnter Bouillon mit ebenfalls 1 % Glykokoll. Das war aber lediglich eine durch den Bestimmungsfehler verursachte Täuschung. Man muß dabei berücksichtigen, daß in der Bouillonnährlösung (noch Peptonzusatz!)[1] schon Aminosäuren vorhanden sind, so daß der Glykokollzusatz in der (auf 20 %) verdünnten Bouillon nicht so fehlerhaft wirken kann wie in der unverdünnten. Erhöhung der Fällungsmenge Kupfersulfat ergab denn auch in unverdünnter Bouillon, die 1 % Glykokoll enthielt, entsprechend höhere Ausbeuten.

Jedenfalls wurde die Eiweißfällung in unseren 0,1 %igen Glykokollnährlösungen stets mit 25 ccm Kupfersulfat vorgenommen. Da zudem das Glykokoll durch das Bakterienwachstum verarbeitet bzw. auch zu Ammoniak abgebaut wird, kann die Methode in den vorliegenden Versuchen keinen Fehler bedingen. Ammoniak stört dabei übrigens nicht, da die Ammoniak-Kupfer-Komplexverbindung in saurer Lösung (die Lösung zur Eiweißbestimmung ist ja stets schwach sauer) nicht beständig ist, was bei der Aminosäure-Kupfer-Komplexverbindung der Fall ist.

Die synthetische Nährlösung.

Die außerordentlich zahlreichen Versuche ergaben zunächst keine recht befriedigende Eiweißbildung aus Glykokoll durch das Bakterium. Es war aber die Absicht, eine rein synthetische Nährlösung herauszufinden, die geeignet ist, bei gewöhnlicher Ösenimpfung, also bei verhältnismäßig geringem Aussaatmaterial, innerhalb von 2 Tagen bei 37° C, der Körpertemperatur, möglichst eine quantitative Verarbeitung des Glykokolls zu Bakterieneiweiß zu gewährleisten. Nur so konnten übersichtliche Verhältnisse, als Grundlage für weitere Versuche, geschaffen werden. Die angegebene zeitliche Befristung war notwendig mit Rücksicht auf den verhältnismäßig kurzen Aufenthalt der Nahrung im Tierkörper, für den man etwa 4 Tage rechnen kann. Gerade die Forderung eines möglichst schnellen Ablaufs des Stoffwechsels wird im allgemeinen nicht sehr berücksichtigt. Eine solche Nährlösung wurde in folgender Zusammensetzung gefunden, die hier kurz als Stamm-

---

[1] Eine Bouillonnährlösung hatte stets folgende Zusammensetzung: 1 % gekörnte Maggifleischbrühe, 1 % Pepton; nach Lösen abfiltrieren, schwach alkalisieren. Ferner wurde, wie bei der Glykokollnährlösung, bei den vorliegenden Versuchen stets 1 % Glucose hinzugefügt.

nährlösung bezeichnet ist, da wir zuletzt hauptsächlich mit ihr arbeiteten. Sie kann aber, wie S. 59 gezeigt werden wird, noch weiter verbessert werden. Wie z. B. Tabelle X zeigt, gewährleistet sie innerhalb von 2 Tagen eine Ausbeute von rund 80 %, d. h. 80 % des Glykokoll-Stickstoffs ist zu Bakterieneiweiß-Stickstoff verarbeitet.

Stammnährlösung: Glucose 1 %, Glykokoll[1] 0,1 %, $MgSO_4$ 0,01 %, K_2HPO_4 0,10 %, KH_2PO_4 0,52 %, $FeSO_4$ 0,01 %, Agar 0,1 %, dest. Wasser.

Wie schon gesagt, arbeiteten wir zunächst stets mit 0,1 % Glykokoll bei 1 % Glucose. Abgesehen davon, daß sich diese Nährlösung vorläufig als die günstigste erwies, hielten wir aus folgenden Gründen einstweilen daran fest: Glykokoll enthält 18,7 % Stickstoff. Bei quantitativem Umsatz würden also aus 100 mg Glykokoll (N . 6,25) 117 mg Eiweiß gebildet sein. Nehmen wir einen Eiweißgehalt von zwei Drittel der Bakterienmasse an, so würden sich 175,5 mg Bakterientrockensubstanz bei 1 g Glucose ergeben, mithin ein ökonomischer Koeffizient von 17,6 (Ernte bezogen auf den als verbraucht angenommenen Zucker). Es ist also genügend Spielraum für die Atmung vorhanden, und die Ausbeute ist ökonomisch einigermaßen befriedigend. Wieweit man die Ausbeuten noch ökonomischer gestalten kann, soll durch weitere Versuche geklärt werden. Endlich wäre noch darauf hinzuweisen, daß die Konzentration von 0,1 % Glykokoll annähernd der bei Fütterungsversuchen an Wiederkäuern verwendeten Konzentration, unter Berücksichtigung des aufgenommenen Wassers, entsprechen dürfte.

Versuchsergebnisse.

Bis die erste, befriedigende Stammnährlösung gefunden war, war allerdings eine große Zahl von Versuchen mit entsprechenden Fehlschlägen zu erledigen. Es erscheint notwendig, die wesentlichsten Gesichtspunkte an Versuchsergebnissen zu erläutern. Auf die inneren und äußeren Ursachen der aufgetretenen Schwierigkeiten wird später im Zusammenhang noch einmal eingegangen werden (S. 61). Bei allen folgenden Versuchen wird der Ausdruck „Ausbeute" in dem oben S. 49 erläuterten Sinne gebraucht.

Eine Glykokollverarbeitung fand in einer ursprünglich benutzten, anders als die Stammnährlösung zusammengesetzten Nährlösung zwar ebenfalls statt, verlief aber sehr langsam, wie Tabelle II zeigt, wozu noch ergänzend bemerkt sei, daß in gleicher Menge Bouillon-Peptonnährlösung innerhalb 24 Stunden 5 bis 7 mg Eiweißstickstoff gebildet werden (Bestimmung im Zentrifugat!). Im übrigen zeigten Gesamtstickstoffbestimmungen, daß nach 19 bzw. 42 Tagen mindestens 25 % des Stickstoffs, offenbar durch Ammoniakverflüchtigung, in Verlust geraten waren. Schon aus diesem Grunde war die Nährlösung also nicht recht brauchbar.

---

[1] Es handelt sich stets um synthetisches Glykokoll der „Gesellschaft für Kohlentechnik" (Dortmund-Eving); für freundliche Überlassung der Präparate sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Tabelle II.

Tage	mg Eiweiß-N	Ausbeute	Tage	mg Eiweiß-N	Ausbeute
4	1,51	20,9	11	2,05	29,5
6	1,70	24,5	19	3,26	47,0
9	1,99	28,6	42	4,64	66,8

Nährlösung: Glucose 1 %, Glykokoll 0,1 %, K_2HPO_4 0,3 %, $MgSO_4$ 0,01 %. Leitungswasser. 40 ccm in 250er Kolbchen, Jenaer 20er Glas. Ösenimpfung. 8. Dezember 1934.

Bessere Ergebnisse, d. h. in wesentlich kürzerer Zeit, wurden erzielt durch eine „Massenimpfung". Dabei wurden die Bakterien in 40 ccm Bouillon gezüchtet, nach 24 oder 48 Stunden abzentrifugiert und in die Glykokollnährlösung eingebracht. Der Versuch in Tabelle III ist ein Beispiel für zahlreiche Versuche.

Tabelle III.

Material	mg Eiweiß-N	Ausbeute
Bouillon-Zentrifugat	5,13	
48 Std. Kulturdauer	14,1; 15,7	
Mittel	14,9	56,3
72 Std. Kulturdauer	9,27; 14,20	23,8 bzw. 52,6

Nährlosung: Glucose 1 %, Glykokoll 0,1 %, K_2HPO_4 0,05 %, $MgSO_4$ 0,01 %. 100 ccm in 500er Kolben. Jenaer 20er Glas. Impfung 30. Juli 1934. Zur Berechnung der Ausbeute ist der Zentrifugat-Stickstoff abgezogen.

Es zeigen sich vor allem starke Unregelmäßigkeiten. In einem anderen Falle ergaben die beiden Parallelen 24,1 bzw. 84,6 % Ausbeute. Daher soll auf diese Methodik nicht weiter eingegangen werden, da sie recht umständlich ist und der Erfolg auf andere Weise erreicht werden konnte.

Tabelle IV.

% K_2HPO_4	Eiweiß-N		Ausbeute	
0,1	1,13	(3,25)	13,0	(37,0)
0,3	1,27	(4,61)	14,6	(53,1)
0,5	2,46	(6,04)	27,2	(69,6)
0,75	2,07		23,8	
1,00	1,43		16,4	

Nährlösung: Glucose 1 %, Glykokoll 0,1 %, $MgSO_4$ 0,01 %. Ösenimpfung am 26. Januar 1935. Kulturdauer 3 Tage. In Klammern anderer Versuch nach 9 Tagen Kulturdauer.

Eine weitere Beobachtung zeigte einen bemerkenswerten Einfluß der Phosphatkonzentration; ein Versuch ist in Tabelle IV wiedergegeben. Man sieht, daß Erhöhung der Phosphatkonzentration die Ausbeute

wesentlich steigert, und daß das Optimum bei 0,5 % K_2HPO_4 liegt; noch höhere Konzentrationen hemmen wieder. *Glinka-Tschernorutzky* hat eine ähnliche Beobachtung an *Bacillus mycoides* gemacht, wonach das Wachstum auf Glykokoll besser war, wenn zu den 0,1 % K_2HPO_4 der Nährlösung noch 0,1 % hinzugefügt wurden.

Zweifellos kann diese Wirkung nicht auf der Versorgung mit Phosphorsäure an sich beruhen; es ist vielmehr an geeignetere Pufferung zu denken. Deshalb wurde zunächst in weiteren Versuchen ein Gemisch von primärem und sekundärem Phosphat geprüft, wobei von der Grundgabe 0,5 % K_2HPO_4 ausgegangen wurde. Der in Tabelle V wiedergegebene Versuch zeigt, daß die beste Wirkung bei der Mischung 0,10 % K_2HPO_4/0,520 % KH_2PO_4, bei einem p_H-Wert von rund 6,0, lag. Die Bakterien waren dieses Mal recht gut gewachsen, die Parallelen schwankten indessen erheblich, was wiederum auf eine geringe Ausgeglichenheit der Nährlösung hindeutet. Die optimale Mischung dieser Tabelle wurde nun bei den weiteren Versuchen beibehalten und ist oben S. 49 als Stammnährlösung bezeichnet.

Tabelle V.

K_2HPO_4	KH_2PO_4	p_H	mg Eiweiß-N	Ausbeute	K_2HPO_4	KH_2PO_4	p_H	mg Eiweiß-N	Ausbeute
0,45	0,065	7,26	3,99	46,0	0,15	0,455	6,10	4,77	55,0
0,40	0,130	6,93	4,02	46,3	0,10	0,520	5,93	5,07	58,5
0,25	0,325	6,33	4,50	51,8	0	0,650	4,99	1,08	12,5

Nahrlosung: Glucose 1 %, Glykokoll 0,1 %, $MgSO_4$ 0,01 %, Leitungswasser. 50 ccm in 250er Kolbchen. Ösenimpfung 22. Februar 1936. Kulturdauer 7 Tage. Infolge der Verwendung von Leitungswasser sind die p_H-Werte höher als in dest. Wasser.

Es ist hier jedoch noch darauf hinzuweisen, daß die Phosphatpufferung keineswegs allein durch ihre Wasserstoffionenpufferung wirkt, sondern daß ihre Wirkung mit der Eisenversorgung zusammenhängt, wie später (S. 59) noch gezeigt werden wird.

Mittlerweile hatte sich herausgestellt, daß Zusatz von Agar in einer Menge von 0,1 %, wobei die Nährlösung eben noch flüssig ist, das Wachstum, gemessen an der Glykokollverarbeitung, noch weiter steigert. Über diese Versuche ist bereits in anderem Zusammenhange [*Rippel* (1, 2)][1]

[1] Über Agarwirkung vgl. weiter noch *Allison* u. *Hoover*, *Allyn* u. *Baldwin*, *Thorne* u. *Walker*. *Pulkki* fand keinen Einfluß von Agar auf das Wachstum von *Bac. mycoides*. Ferner soll nach *Kriuchkowa* u. *Popowa* in Böden mit extrem hohem Eisengehalt *Azotobacter*-Wachstum erst bei starker Phosphorsäurezufuhr oder bei Zusatz von kolloidalen Stoffen (Kieselsäure, Agar) stattfinden, die Komplexverbindungen damit ergeben sollen. Indessen zeigen die Zahlen kaum eine Agarwirkung. - Bei den

kurz berichtet. Diese Zahlen sind hier noch einmal an dem einen Beispiel mit den Ausbeuten zusammengestellt (Tabelle VI). Bei Agarzusatz nähert sich die Ausbeute also nach 5 Tagen 100 %, während sie ohne Agar in dieser Zeit noch auf 30 % stand; später steigt sie jedoch auch hier noch weiter an, was hier indessen nicht berücksichtigt werden soll.

Tabelle VI.

Kulturdauer Tage	mg Eiweiß-N		Ausbeute	
	ohne Agar	mit Agar	ohne Agar	mit Agar
2	2,30	2,71	26,6	31,1
4	2,55	3,98	29,4	45,9
5	2,52	7,40	29,0	85,3

Stammnährlosung. 50 ccm in 250er Kölbchen. Ösenimpfung.

Auch diese Versuche befriedigten indessen noch nicht. Einerseits erscheint das Wachstum, verglichen mit Bouillon z. B., noch ziemlich mäßig. Von der Ausgangsforderung einer möglichst 100 %igen Ausbeute nach 2 Tagen kann noch keine Rede sein. Endlich erschien die Agarwirkung nicht immer so deutlich wie in dem obigen Beispiel. Es könnten Versuche angeführt werden, bei denen Agar kaum oder gelegentlich sogar schlecht wirkte. Auch auf diese zahllosen Versuche einzugehen, erübrigt sich, da weiter unten gezeigt werden wird, daß Agar tatsächlich wirkt, die Ursache der Fehlschläge also anderweit gesucht werden mußte.

Es war nämlich die naheliegende Vermutung aufgetaucht, daß noch irgendwelche Stoffe anorganischer oder auch organischer Natur wirksam seien. Wir hatten von diesem Gesichtspunkt aus auch anfänglich stets Leitungswasser als Träger von anorganischen Spurenstoffen verwendet, worauf später eingegangen werden soll. Jedenfalls prüften wir kurz vor den Agarversuchen und teilweise auch zusammen mit diesen Versuchen die Wirkung eines Zusatzes verschiedener Art, von geringen Mengen Bouillon, von Hefe und von Bouillonasche. Namentlich Bouillon wurde berücksichtigt, weil auf ihr die Bakterien ausgezeichnet wachsen. Auch diese zahlreichen Versuche seien hier nicht erwähnt, und nur soviel sei mitgeteilt, daß die Bakterien bei Zusatz von geringen Mengen Bouillon (0,01 %) zur Glykokollnährlösung nicht besser wuchsen als ohne diesen Zusatz. Zusatz von Bouillonasche (mit HCl abgeraucht, in Wasser gelöst, nicht sauer reagierend) hatte völlig schwankende Ergebnisse, bald Förderung, bald schwache Hemmung, ohne daß etwas

Versuchen von *Schroder* (Centralbl. f. Bakt. II, 85, 177, 1932) handelt es sich um Zusatz von 0,5 % Agar, also um eine feste Gallerte, die nun als festes Substrat wirkt, zumal das Wachstum auf Tonplatten noch besser war; ich weise nochmals ausdrücklich darauf hin, daß es sich bei der vorliegenden Agarwirkung um ein noch *flüssiges* Substrat handelt.

Greifbares herauskam. Vermutlich liegt die Ursache in dem Kalkgehalt der Aschen, wie die nunmehr zu schildernden Versuche zeigen, und wie auch daraus hervorgeht, daß der Aschenzusatz um so weniger schädlich wirkte, je geringer er war. Mit Rücksicht auf das gute Wachstum der Bakterien in Bouillon war eine Schädigung der Bakterien durch anorganische Stoffe in der Bouillon primär nicht anzunehmen.

Hinsichtlich des guten Wachstums in Bouillon muß indessen noch darauf hingewiesen werden, daß es an sich gar nicht mit dem Wachstum in unserer synthetischen Nährlösung zu vergleichen ist, da ja der Stickstoffgehalt ganz anders ist. Diesen Umstand berücksichtigt man in der Literatur im allgemeinen nicht. Wir können im Grunde genommen nur Nährlösungen mit gleichem Stickstoffgehalt vergleichen. Auf derartige Versuche wird noch zurückzukommen sein.

Die Lösung der ganzen Schwierigkeiten brachte nun die Beobachtung, daß nicht sterilisierte Nährlösungen bedeutend besseres Wachstum ergaben als sterilisierte. Aus mancherlei Gründen war nicht mit der Wirkung der Unsterilität an sich, also nicht mit der fördernden Wirkung sich entwickelnder Begleitbakterien zu rechnen, sondern mit dem Ausfallen von Calciumphosphat und Calciumcarbonat und der adsorptiven Wirkung auf das ebenfalls ausfallende Eisenphosphat. Schon *Ruhland* hatte bei Knallgasbakterien diese Beobachtung gemacht, und *Steinberg* zeigte, daß beim Vorhandensein von Calciumcarbonat die Nährlösung weitgehend von Eisen gereinigt werden kann. Wenn auch bei unseren Versuchen die Ausfällung als Bodensatz in der Nährlösung verblieb, so mußte doch das aerobe Wachstum weitgehend dadurch gestört werden, wie ja auch der Agarzusatz in erster Linie das aerobe Gedeihen fördert.

Es wurde schon hervorgehoben, daß von diesem Gesichtspunkt aus die Verwendung von Leitungswasser, das anorganische Spurenstoffe zuführen sollte, gerade verkehrt war, zumal das Göttinger Leitungs-

Tabelle VII.

Behandlung	Kulturdauer 3 Tage		Kulturdauer 6 Tage	
	mg Eiweiß-N	Ausbeute	mg Eiweiß-N	Ausbeute
1. Leitungswasser; Phosphate in destilliertem Wasser getrennt sterilisiert . .	4,08	46,7	6,40	73,2
2. Leitungswasser	2,00	22,9	2,86	32,7
3. Destilliertes Wasser . . .	3,22	36,8	7,22	82,6

Stammnährlösung ohne Eisen. Ösenimpfung 13. Juni 1936. 50 ccm in 250er Kölbchen. Nr. 1 wurde so behandelt, daß eine um 20 % höher konzentrierte Nährlösung mit Leitungswasser hergestellt und sterilisiert wurde. Ferner wurden die Phosphate in 10 ccm dest. Wasser gelöst und sterilisiert. Dann werden beide Lösungen steril zusammengegossen.

wasser stark kalkhaltig ist und das gelöste Calciumbicarbonat beim Kochen als Calciumcarbonat ausfällt. Der in Tabelle VII wiedergegebene Versuch zeigt denn auch, daß beim getrennten Sterilisieren von Phosphaten, in dest. Wasser gelöst, und von Leitungswassernährlösung mit den übrigen Bestandteilen ein weit besseres Wachstum erzielt wird als in normal sterilisierten Leitungswassernährlösungen. Ferner ist dest. Wasser dem Leitungswasser weit überlegen. Zweifellos müßte die Eisenmenge in der Leitungswassernährlösung absolut völlig ausreichen; es kann eben nur seine Verteilung zu ungünstig sein.

Daß tatsächlich lediglich das Eisen der entscheidende Faktor ist, zeigt der Versuch in Tabelle VIII; bei genügendem Eisengehalt der Nährlösung verschwinden also die Unterschiede zwischen Leitungswasser und dest. Wasser. Die p_H-Werte zeigen gleichzeitig, daß die Nährlösung gut puffert; nur bei schwacher Glykokollverarbeitung tritt, infolge Ammoniakbildung, eine geringe Verschiebung nach der weniger sauren Seite ein. Bei guter Glykokollverarbeitung sind die p_H-Werte jedenfalls während der Versuchsdauer konstant.

Tabelle VIII.

Behandlung	p_H zu Beginn	p_H am Ende	mg Eiweiß-N	Ausbeute
Leitungswasser ohne Eisen . . .	6,31	6,98	1,67	19,1
„ mit „ . . .	6,32	6,46	7,06	80,8
Destilliertes Wasser ohne Eisen	6,25	6,81	3,28	37,5
„ „ mit „	6,26	6,14	7,13	81,6

Stammnährlösung, aber nur 0,005 % $FeSO_4$. Ösenimpfung 20. Juni 1936. Kulturdauer $3^1/_2$ Tage. 50 ccm in 250er Kölbchen.

Die im Versuch der Tabelle VIII verwendete Eisenmenge ist jedoch noch nicht optimal, wie die in Tabelle IX wiedergegebenen Versuche zeigen. Steigerung der 0,005 %igen $FeSO_4$-Gabe auf 0,010 % hatte noch einen weiteren beachtenswerten Anstieg zur Folge, und zwar bei der nunmehr zur Anwendung kommenden kürzeren Versuchs-

Tabelle IX.

Behandlung	mg Eiweiß-N	Ausbeute	Behandlung	mg Eiweiß-N	Ausbeute
Ohne Eisen . .	2,83	32,4	Ohne Eisen . .	2,66	29,9
0,001 % $FeSO_4$	4,00	45,8	0,005 % $FeSO_4$	5,11	58,5
0,005 % „	3,80	44,5	0,010 % „	6,19 (6,41)	70,8 (73,3)
0,010 % „	7,10	81,2	0,025 % „	0,58 (3,96)	6,6 (45,3)
Kulturdauer $2^1/_2$ Tage			Kulturdauer 2 Tage		

Stammnährlösung mit variierter Eisensulfatkonzentration. Ösenimpfung links 26. Juni 1936, rechts 1. Juli 1936. 50 ccm in 250er Kölbchen.

dauer ($3^1/_2$ Tage in Tabelle VIII, jetzt $2^1/_2$ und 2 Tage). Auf die Verkürzung der Wachstumszeit ist hier ja besonderer Wert gelegt. Auch bei weniger günstigen Bedingungen (Tabelle II und VI) hat ja verlängerte Wachstumszeit ebenfalls gute Ausbeuten ergeben. 0,025 % Eisensulfat hat im Versuch rechts bemerkenswert schädlich gewirkt. Die in Klammern beigefügten Zahlen, die nach 3 Tagen Kulturdauer gewonnen sind, zeigen jedoch eine auffallende Erholung. Da in beiden Fällen Eisen als Eisenphosphat ausfallen muß, Phosphat aber in großem Überschuß zugegen ist, so ist der Mechanismus nicht klar; es soll hier nicht darauf eingegangen werden.

Weiterhin zeigen die Versuche, wie schon erwähnt, nunmehr sehr gute Ausbeuten, wie sich weiter aus Tabelle X ergibt. Diese soll noch etwas Weiteres zeigen: Während der Sommerferien 1936 waren die Versuche etwa 7 Wochen unterbrochen. Als sie danach wieder aufgenommen wurden, wuchsen die Bakterien außerordentlich schlecht (Tabelle X, 31. August). Das konnte, wie die Zahlen zeigen, nicht daran liegen, daß damals ein neues Glykokollpräparat verwendet wurde, da das alte aufgebraucht war. Wir wußten keinen anderen Weg, als die Kulturen möglichst häufig überzuimpfen. Der erste Versuche vom 31. August war von der etwa 7 Wochen alten Kultur übergeimpft worden, so daß der erste Fehlschlag mit dem zu hohen Alter des Impfmaterials erklart werden konnte, zumal die nächste Überimpfung vom 3. September zwar noch kein völlig befriedigendes, aber doch ein wesentlich besseres Ergebnis brachte. Die nächste vom 9. September brachte indessen wiederum einen Rückschlag. Von da an bessert sich die Ausbeute im allgemeinen etwas, bleibt aber stets unternormal und springt auffällig hin und her. Die letzte Unregelmäßigkeit zeigte sich am 21. September, wo die beiden Parallelen, die meist befriedigend übereinstimmten, völlig abweichen. Von da an ist die Kultur wieder normal und gibt jetzt Ausbeuten von rund 80 % innerhalb von 2 Tagen.

Tabelle X.

Zeit der Impfung (1936) Alter des Präparats	mg Eiweiß-N	Ausbeute	Zeit der Impfung 1936	mg Eiweiß-N	Ausbeute
31. VIII., altes Praparat	1,44	16,5	21. IX.	3,60; 7,20	40,4; 80,7
31. VIII., neues „	1,32	14,8	22. IX.	7,63	85,5
3. IX., altes „	4,82	55,2	23. IX.	7,35	82,4
9. IX., neues „	1,59	17,8	24. IX.	7,35	82,4
15. IX., altes „	3,39	38,8	26. IX.	6,55	73,4
15. IX., neues „	2,45	27,5	27. IX.	7,13	79,9
17. IX., „ „	4,68	52,4	28. IX.	6,91	77,5
19. IX., „ „	2,37	26,6	29. IX.	7,56	84,8

Stammnährlösung. 50 ccm in 250er Kolbchen. Altes Präparat 17,48 %, neues Präparat 17,84 % N.

Es sei noch ausdrücklich bemerkt, daß diese Besserung der Kultur nichts mit einer Wiederanpassung an die Glykokollnährlösung zu tun hat, da die Stammkulturen ja stets auf Bouillonschrägröhrchen weitergezüchtet wurden. Man könnte auch meinen, daß die oben erwähnte Uneinheitlichkeit der Kultur (flache und runde Kolonien) mit unserer Erscheinung zusammenhinge. Aber abgesehen davon, daß die beiden Formen sich nach Aussage der Tabelle XII nicht wesentlich verschieden verhalten, ergab ein Versuch, in dem die beiden Stämme jeweils getrennt und in Mischkultur geprüft wurden, die gleichen Werte. Die beobachtete Erscheinung muß also wohl damit zusammenhängen, daß die Kultur durch häufiges Überimpfen arbeitsfähig erhalten bzw. nach einer Ruheperiode vor Beginn neuer Versuche häufig in kurzen Abständen umgeimpft werden muß.

Obwohl in dieser Abhandlung nur auf die Herstellung einer synthetischen Nährlösung eingegangen werden soll, scheint es doch erwünscht, noch einige Versuche mit anderen Mikroorganismen anzuführen, die zeigen, daß die Stammnährlösung nicht etwa allgemein optimale Eigenschaften hat, sondern gerade für unser Darmbakterium bei Glykokollernährung geeignet ist. Wieweit sich diese Eignung noch auf weitere Mikroorganismen erstreckt, soll später untersucht werden. Tabelle XI zeigt einen Vergleich mit *Aspergillus niger* und *Azotobacter chroococcum*. Für den letztgenannten Organismus konnte jedoch die Stammnährlösung nicht verwendet werden, da er darauf nicht wuchs; es wurde also die normale *Azotobacter*-Nährlösung benutzt.

Man sieht, daß für *Aspergillus* die für das Darmbakterium optimale Eisenkonzentration bereits schädlich wirkt. Die Parallelversuche stimmten gut überein; in Klammern ist außerdem das Ergebnis eines zweiten Versuchs beigefügt. Für diesen wenig wählerischen Organismus ist das Ergebnis zweifellos

Tabelle XI.

Organismus	Behandlung	mg Eiweiß-N
Darmbakterium	ohne Eisen	3,10
"	mit "	4,82
Aspergillus niger	ohne "	6,91 (6,70)
" "	mit "	4,46 (3,89)
Azotobacter . . .	ohne Stickstoff " Eisen	2,53 (1,95)
" . . .	ohne Stickstoff mit Eisen	7,78 (8,64)
" . . .	mit Glykokoll ohne Eisen	0,81 (1,22)
" . . .	mit Glykokoll " Eisen	1,34 (1,51)

Für *Darmbakterium* und *Aspergillus* Stammnährlösung. 37° C. Für *Azotobacter* Mannit 2 %, K_2HPO_4 0,1 %, $CaCO_3$ 0,1 %, $MgSO_4$ 0,05 %, Na_2MoO_4 0,0005 %. 29° C. Eisengabe 0,010 % $FeSO_4$. Jeweils 50 ccm in 250er Kölbchen.

überraschend. Bei *Azotobacter*, für das die angewendete Eisensulfatkonzentration ebenfalls optimal, wie man aus der Tabelle ersieht, zur Stickstoffbindung aber auch für die Nitratverarbeitung ist[1], kann Glykokoll bei Eisenzusatz nur wenig besser verwertet werden als ohne Eisenzusatz. Auch hier stimmten die in diesem Falle 3 Parallelen gut überein; außerdem ist in Klammern das Ergebnis eines zweiten Versuchs in Tabelle XI beigefügt.

Weiterhin wurde noch zum Vergleich ein anderer Sporenbildner herangezogen, *B. subtilis*; *B. mycoides* wuchs unter den gleichen Bedingungen, auch in Bouillon, so langsam, daß er beim Vergleich überhaupt ausschied. Wie Tabelle XII oben zeigt, kann *B. subtilis* unter den Bedingungen des Darmbakteriums, also bei 37° C, Glykokoll nur schwach verarbeiten; auch in Bouillon zeigen die Darmbakterien viel besseres Wachstum. In diesem Falle wurden die beiden oben erwähnten Stämme des Darmbakteriums (rund und flach) miteinander verglichen; ein grundsätzlicher Unterschied besteht nicht; doch ergab Stamm flach

Tabelle XII.

Organismus	Stammnährlösung mg Eiweiß-N	Ausbeute	Bouillon + 1 % Glucose mg Eiweiß-N
Darmbakterium, Stamm rund . . .	7,56	84,8	15,84
„ „ flach . .	8,50	95,3	15,12
B. subtilis	1,51	16,9	8,64

Organismus	Stammnährlösung mg Eiweiß-N	Ausbeute	Bouillon unverdünnt + 1 % Glucose mg Eiweiß-N	Bouillon verdünnt + 1 % Glucose mg Eiweiß-N	Ausbeute
		Bei 37° C.			
Darmbakterium, Stamm rund .	7,49	84,0	26,78	5,40	60,6
B. subtilis . . .	1,44	16,2	20,16	4,68	52,5
		Bei 30° C (42° C).			
Darmbakterium, Stamm rund .	2,52 (5,19)	28,2 (58,2)	31,25	4,68	52,5
B. subtilis . . .	1,15 (1,29)	12,9 (14,5)	22,90	4,75	53,2

Jeweils 50 ccm Nahrlosung in 250er Kölbchen. Im anderen Versuch *Darmbakterium* in Stammnährlösung: 7,34 mg (= 82,3 % Ausbeute). Im anderen Versuch *Darmbakterium* in verdünnter Bouillon: 6,26 mg (= 70,2 % Ausbeute).

[1] Vgl. *A. Rippel* (2). Im vorliegenden Falle ergab sich mit 0,128 % KNO_3 (= der in 0,1 % Glykokoll gegebenen Stickstoffmenge) ohne Eisen 2,60, mit Eisen 8,71 mg Eiweißstickstoff.

in Glykokollnährlösung eine noch bessere Ausbeute, die fast an 100 herankommt; ob es sich um einen stets vorhandenen Unterschied handelt, wurde noch nicht geprüft. Einstweilen wurde mit „Stamm rund" weitergearbeitet.

Da für *B. subtilis* die Temperatur von 37° C vielleicht nicht optimal war, haben wir noch das Wachstum bei 30 und 42° C (in Klammern) verglichen (Tabelle XII unten). Bei 37° C ist das Bild wie vorher; bei 30° C ist in Glykokollnährlösung das *Darmbakterium* sehr viel stärker zurückgegangen als *B. subtilis*; auch bei 42° C ergab *B. subtilis* keine bessere Ausbeute[1]. Jedenfalls konnte für die schlechte Verarbeitung des Glykokolls durch dieses Bakterium die Temperatur nicht verantwortlich gemacht werden. In Bouillon (nur bei 30 und 37° C) sind beide Bakterien besser gewachsen; auch hier aber bleibt *B. subtilis* gegen das *Darmbakterium* zurück. Endlich haben wir hier noch das Wachstum in verdünnter Bouillon verglichen, d. h. in Bouillon, die soweit verdünnt war, daß der Stickstoffgehalt gleich dem der Glykokollnährlösung war, bei Gleichheit der übrigen Nährstoffe, einschließlich der Phosphatpufferung der Stammnährlösung. Aus Versehen wurde in der Nährlösung in der Tabelle kein Magnesium gegeben; unter der Tabelle ist indessen ein anderer Versuch angegeben, der die richtigen Verhältnisse wiedergibt. Das *Darmbakterium* wächst auch hier besser als *B. subtilis* und nutzt, wie man sieht, die Bouillon nicht einmal so gut aus wie das Glykokoll. Es scheint uns sehr wesentlich, daß man bei den allgemeinen Angaben: Wachstum in Bouillon besser als in einer synthetischen Nährlösung, diesen Gesichtspunkt berücksichtigt. Es soll an dieser Stelle jedoch nicht weiter darauf eingegangen werden.

Nachdem alle die geschilderten Verhältnisse geklärt waren, insbesondere die Eisenversorgung, fragte es sich noch, wieweit Eisenversorgung und Phosphatpufferung ineinandergreifen. Obwohl zur Beantwortung dieser Frage die genaue Aufnahme der verschiedenen Phosphat- und Eisenkonzentrationen notwendig ist, soll noch ein vorläufiger Versuch angeführt werden (Tabelle XIII), der jedenfalls andeutet, in welcher Weise die genannten Faktoren ineinander greifen. Man sieht beim Vergleich von 1 und 3, daß man durch $^1/_4$ der Phosphatmischung zwar einen sehr starken Rückgang in der Ausbeute erhält, der aber (Nr. 4) durch Herabsetzung der Eisengabe zum größten Teil aufgehalten werden kann. Umgekehrt konnte selbst bei reiner K_2HPO_4-

[1] Dieser Versuch wurde besonders angesetzt, wobei noch eine besondere Kontrolle bei 37° C gezogen wurde, die eigentümlicherweise schlecht wuchs. Für das *Darmbakterium* ergaben sich 3,60, für *B. subtilis* 1,44 mg Eiweißstickstoff. Der obige Schluß wird davon indessen nicht berührt.

Tabelle XIII.

Nr.	Behandlung	mg Eiweiß-N	Ausbeute
1	Stammnährlosung	7,34	82,3
2	Wie 1, ohne Eisen	4,10	46,0
3	Wie 1, aber 1/4 der Phosphatmischung	1,59	17,8
4	Wie 3, aber nur 2 mg-% $FeSO_4$	6,05	67,8
5	Wie 1, aber 0,5 % K_2HPO_4 als Phosphatmischung	8,78	98,4

Versuch wie üblich. Kulturdauer 2 Tage, 21. bis 23. November 1936.

Pufferung, aber bei offenbar ausreichender Eisenversorgung, die Ausbeute bis fast 100 % gesteigert werden. Wenn nach Aussage von Tabelle V die Ausbeute bei Verwendung von reinem K_2HPO_4 sinkt, so lag das zunächst an der damals, insbesondere bei Verwendung von Leitungswasser, unzureichenden Eisenversorgung. Es muß allerdings betont werden, daß weitere Versuche diese günstigen Ergebnisse bei reinem K_2HPO_4 nicht in dem Maße zeigten; es kommen hier zweifellos noch sekundäre, nicht mit dem Eisen zusammenhängende Wirkungen hinzu. Auf diese Frage kann hier indessen nicht weiter eingegangen werden, da vorher die genaue Festlegung der Eisen-Phosphat-Ertragsfläche vorgenommen sein muß. Vorläufig jedenfalls halten wir an der oben S. 49 erwähnten Stammnährlösung fest, die bisher die gleichmäßigsten Ergebnisse zeitigte und auch deshalb besonders wertvoll ist, weil die schwach saure Reaktion der Nährlösung eine leichtere d. h. einmalige Sterilisation erlaubt.

Endlich ist in Tabelle XIV noch ein letzter Versuch aufgeführt, der zeigt, daß unter den Bedingungen der Stammnährlösung neben dem Eisen der Agar seine entwicklungsbeschleunigende Wirkung zeigt, was aus dem Versuch der Tabelle VI noch nicht hervorgehen konnte, da dort noch nicht besonders auf die Eisenversorgung geachtet wurde.

Tabelle XIV.

Eisengabe	Ohne Agar		Mit Agar	
mg-% $FeSO_4$	mg Eiweiß-N	Ausbeute	mg Eiweiß-N	Ausbeute
0	0,95	10,6	2,09	23,4
1	2,38	26,7	4,11	46,1
3	2,45	27,5	6,34	71,1
6	2,30	25,8	7,27	81,5
10	3,02	33,9	7,13	80,0

Stammnährlösung wie üblich, bis auf die Eisenversorgung. Kulturdauer 2 Tage, 26. bis 28. September 1936. Parallelen bei „Mit Agar“ gut übereinstimmend, bei „Ohne Agar“ und 0 $FeSO_4$ 0,60 und 1,29, 1 $FeSO_4$ 1,87 und 2,88, 3 $FeSO_4$ 1,87 und 3,02, 10 $FeSO_4$ 2,16 und 3,88.

Auffallend ist wieder die glatte Ertragsreihe bei „Mit Agar“, während die Reihe „Ohne Agar“ sehr unregelmäßig ist, was an der Unregelmäßigkeit der (unter der Tabelle angegebenen) Parallelwerte liegt, die bei jener Reihe stets gut übereinstimmten. Auf diese, bei ungünstigen Verhältnissen auftretende Erscheinung wurde bereits an anderer Stelle aufmerksam gemacht[1].

Rückblick.

Überblickt man die Ergebnisse, so kann festgestellt werden, daß die gestellte Aufgabe gelöst ist, nämlich eine synthetische Nährlösung zu finden, in der das isolierte Darmbakterium innerhalb 48 Stunden bei gewöhnlicher Ösenimpfung das Glykokoll fast quantitativ zu Eiweiß verarbeitet. Bei der Zusammensetzung der Nährlösung stört allerdings die Verwendung des, wenn auch in geringer Menge, zugesetzten Agars etwas; man mag sich fragen, ob die Nährlösung tatsächlich rein synthetischer Natur ist. Es ist indessen an anderer Stelle [*Rippel* (1)] gezeigt worden, daß Agar lediglich durch seine Kolloidstruktur wirkt. Es liegt kein Grund vor, anzunehmen, daß es hier anders ist. Insbesondere können in ihm keine wirksamen Spurenstoffe organischer Natur vorhanden sein. Wenn z. B. das Wachstum des Bakteriums auf Bouillon viel besser ist als auf einer ungeeignet zusammengesetzten Glykokollnährlösung, diese aber durch Zusatz von geringen Mengen Bouillon (S. 52) nicht geeigneter wird, so deutet das schon darauf hin, daß das schlechte Wachstum auf Glykokoll nicht durch das Fehlen eines in Naturstoffen vorhandenen Wuchsstoffes bedingt sein kann.

Im übrigen kann das Wachstum auf Bouillon vergleichsweise nicht einmal als besonders hervorragend bezeichnet werden. Denn deren Gehalt an Stickstoff war 22,2mal so hoch wie der der Glykokollstammnährlösung, die Eiweißbildung aber nur viermal so hoch (Tabelle XII). Dabei ist zu berücksichtigen, daß in der Bouillon außer dem, wie der Glykokollnährlösung zugesetzten, 1 % Zucker noch sehr viel Stickstoffverbindungen mit einem Kohlenstoffanteil vorhanden sind, der zweifellos weit besser zu verarbeiten ist als der Kohlenstoffanteil des Glykokolls. Ferner wird Bouillon, auf gleichen Stickstoffgehalt gebracht wie die Glykokollnährlösung, nicht einmal so gut verwertet wie diese, auch wenn sie alle sonstigen Stoffe der Glykokollnährlösung enthält.

Die Versuche haben denn auch ergeben, daß in erster Linie die anorganische Zusammensetzung der Nährlösung das Wesentliche ist, wobei genügende Eisenversorgung, je nach der Form der Phosphatpufferung, den eigentlich entscheidenden Faktor darstellt, hinter dem

---

[1] *A. Rippel* (2), S. 591.

zweifellos die Wirkung sonstiger anorganischer Spurenstoffe völlig zurücktritt. Auch in dieser Hinsicht kann die Nährlösung also als eine synthetische betrachtet werden, obwohl ein gewisser Gehalt des zugesetzten Agars an anorganischen Stoffen die Forderung einer rein synthetischen Nährlösung nicht ganz erfüllt. Wir haben aber davon abgesehen, ein reineres Kolloid als Zusatzmittel zu suchen, da es uns vorerst darauf ankommt, die Frage der Bedingungen der Eiweißbildung zu lösen, und die Zeit nicht durch anders gerichtete Versuche beansprucht werden soll.

Man mag sich hier die Frage vorlegen, ob alle Umwege, die gemacht wurden, um die geeignete Nährlösung zu finden, und die in obiger Darstellung nur zu einem kleinen Teile aufgenommen sind, nötig waren. Man wird leicht geneigt sein, diese Frage — wenigstens bis zu einem gewissen Grade — zu verneinen. Aber es erscheint wichtig, einmal in diesem Zusammenhange kurz die augenblickliche Lage in der Frage der Herstellung synthetischer Nährlösungen zu betrachten. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß man dabei zur Zeit förmlich unter einer dreifachen Hypnose steht, die den Gang der Untersuchungen weitgehend beeinflußt.

Erstens sucht man die schlechte Wirkung einer Nährlösung in einer Nichteignung der verwendeten Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle oder beider. Im vorliegenden Falle war, in Hinsicht auf den Stickstoff, eine absolute Bindung gegeben. Auch die Kohlenstoffquelle, Glucose, mußte geeignet sein, da sie sich z. B. bei Zusatz zu Bouillon als wirksam, d. h. ertragsteigernd erwiesen hatte. Um so stärker mußten die beiden anderen Punkte in Erscheinung treten.

Zweitens sucht man bei Mißerfolgen mit synthetischen Nährlösungen nach der Wirkung von Naturstoffen, sei es in Extrakten von Pflanzen- oder Tiersubstanzen oder auch in Form rein dargestellter Wuchsstoffe (im allgemeinsten Sinne) oder endlich in dem Einfluß von gleichzeitig in der Kultur anwesenden anderen Mikroorganismen. Solche Bestrebungen treten in der augenblicklichen Literatur so stark in Erscheinung, daß ein Eingehen auf Beispiele unterlassen werden kann.

Drittens endlich ist man versucht, Fehlschläge dem Fehlen von Spurenstoffen anorganischer Natur zuzuschreiben, deren Kreis heute erheblich erweitert ist. Es sei hier nur ein allgemein verbreitetes und bekanntes Element, das Calcium, erwähnt, dessen Fehlen sich z. B. bei Versuchen von *Boltjes* über die Züchtung von Nitrit- und Nitratbildnern, ferner, nach *Giesberger*, bei *Spirillen* (möglicherweise als Antagonist gegen Magnesium nach *Rippel* und *Stoess*) und nach *Gistl* bei *Merulius* als unentbehrlich erwiesen hatte. Wie sich allerdings die mit Rücksicht auf solche Überlegungen erfolgte Verwendung von Leitungswasser in negativer Richtung auswirkte, wurde oben S. 53 gezeigt.

Selbstverständlich sind alle die genannten Fragekomplexe von höchster Wichtigkeit. Aber, wie gesagt, förmlich unter solcher Hypnose stehend, vernachlässigt man zu sehr die allgemeinen Grundlagen, die vorangehen müssen, bevor man die anderen Fragen restlos klären kann. Dahin gehört zweifellos die Frage nach der Eisenversorgung, deren Bedeutung bei der Wasserkultur der höheren Pflanzen längst erkannt ist, die man aber bei Mikroorganismen bisher stark vernachlässigt und in erheblicherem Umfange nur für *Azotobacter* beachtet hat. Offenbar hat man sich zu lange von der Frage leiten lassen, ob Eisen überhaupt ein für Mikroorganismen notwendiges Element sei.

Im vorliegenden Falle genügte jedenfalls nicht etwa die Zufuhr der absolut notwendigen Mengen von Eisen, sondern zweifellos spielen andere Momente hierbei eine ausschlaggebende Rolle. Zunächst gilt das für den Zusatz eines Kolloids, von Agar. Man könnte geneigt sein, diese Wirkung lediglich darin zu suchen, daß hierdurch das Eisen gleichmäßiger in der Nährlösung verteilt oder auch in eine Zustandsform übergeführt wird, in der es leichter aufnehmbar oder verwertbar ist (vgl. oben S. 51, die von *Kriuchkowa* und *Popowa* angenommene Komplexbildung). Für *Azotobacter* habe ich indessen [*Rippel* (2)] diese Erklärung nicht für völlig befriedigend gehalten aus Gründen, die hier nicht mehr auseinandergesetzt werden sollen. Der Agarzusatz schien vielmehr eine bessere Versorgung der Nährlösung mit Sauerstoff zu gewährleisten.

Ob das auch hier zutrifft, lasse ich dahingestellt. Es erscheint durchaus möglich, daß in diesem Falle die Zustandsform des Eisens eine ebenso wichtige Rolle spielt, wie sie auch sicherlich für *Azotobacter* nicht ganz unwesentlich ist. In diese Richtung deuten die Beziehungen zwischen Phosphatpufferung und Eisenkonzentration.

Es erscheint mir sehr wesentlich, noch einmal darauf hinzuweisen, daß eine Phosphatpufferung nicht nur vom Gesichtspunkt der reinen Wasserstoffionenpufferung (im Sinne der Verhinderung einer schädlichen Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration während des Wachstums) zu betrachten ist, sondern auch von der Eisenversorgung aus. Möglicherweise spielt diese oft oder hin und wieder sogar eine größere Rolle als jene und ist vor allem, wie oben gezeigt wurde, für verschiedene Mikroorganismentypen äußerst verschieden. Wieweit nun die Löslichkeit bzw. die Verwertbarkeit des Eisens mittelbar oder unmittelbar von der Wasserstoffionenkonzentration bestimmt wird, ist noch genauer festzustellen. Allerdings geht schon aus den oben mitgeteilten Versuchsergebnissen hervor, daß das Eisen nicht nur durch die Wasserstoffionenkonzentration an sich beeinflußt wird, da bei verschiedener Phosphatpufferung (also verschiedenem p_H-Wert) verschiedene Eisenkonzentrationen, die, absolut genommen, für die Versorgung des Bakteriums ausreichend wären, gleich wirksam sind bzw. gleiche Eisenkonzentrationen verschieden gut wirken. Man kann sich leicht aus-

rechnen, daß die Eisenmenge nicht etwa so groß ist, daß alle Phosphorsäure abgebunden ist. Danach kann es sich also nur um eine Verteilungs- oder Zustandsform des Eisens handeln, die wirksam ist. Auch hierüber sollen zunächst für das vorliegende Bakterium weitere Untersuchungen Aufschluß geben, wie denn überhaupt die vorliegende Frage erst dann fruchtbringender erörtert werden kann.

Was weiter die sehr verschiedene Reaktion verschiedener Mikroorganismentypen der gleichen Eisenkonzentration gegenüber, bei Gegenwart von Glykokoll, betrifft, so kann nicht nur eine Wirkung des Eisens, sondern auch eine besondere Wirkung des Glykokolls in Frage kommen, worüber auf die oben S. 46 gemachten Ausführungen verwiesen sei.

Die Forderung einer wie oben gekennzeichneten, systematischen Erforschung der Zusammensetzung einer Nährlösung in quantitativer Hinsicht ist vor allem zu stellen dann, wenn es sich um die Frage der *quantitativen* Wirkung einer Nährlösung handelt, die, wie sich aus der einleitenden Literaturübersicht ergab, namentlich bei den Bakterien bisher ungebührlich stark zurückgetreten ist. Dies tritt noch stärker in Erscheinung, wenn wir unter quantitativ nicht nur die quantitative Messung eines Stoffwechselvorganges an sich verstehen, sondern darüber hinaus die möglichst quantitative Verarbeitung der Stoffe, deren Umsatz untersucht werden soll.

Es werden sich daraus noch Fragen weitergreifender Art entwickeln; auf eine von ihnen sei hier noch aufmerksam gemacht. Soweit bisher Versuche vorliegen, besteht beim Variieren zweier Ertragsfaktoren nur *ein* Maximum. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß die Dinge im Falle Eisen-Phosphorsäure anders liegen. Denn beim Eisen scheint nicht die absolute, fur den Stoffwechsel gebrachte Menge entscheidend zu sein, sondern seine Zustandsform. Theoretisch sind demnach mehrere Maxima denkbar, wenn nämlich bei verschiedenem Phosphatgehalt der Nährlösung und bei verschiedenem Eisengehalt die Menge des physiologisch wirksamen Eisens gleich ist. Das ist in den obigen Versuchen bereits angedeutet. Denn bei verringerter Phosphatkonzentration bringt eine verringerte Eisenkonzentration eine Ertragssteigerung gegenüber höherer Eisenkonzentration zustande, die sich dem Ertrag bei höherer Eisenkonzentration bei höherer Phosphatkonzentration nähert (Tabelle XIII). Um diese Frage genauer zu klären, muß indessen, wie oben schon gesagt wurde, die ganze Eisen-Phosphorsäure-Ertragsfläche aufgenommen werden, worüber später berichtet werden soll.

Zusammenfassung.

Aus Dünn- und Dickdarm des Rindes wurde ein aerobes sporenbildendes Bakterium — *Bacillus glycinophilus nov. spec.* — isoliert und auf die Bedingungen untersucht, unter denen Glykokoll in einer

0,1 %igen, 1 % Glucose neben anorganischen Salzen enthaltenden Nährlösung innerhalb 48 Stunden fast quantitativ zu Eiweiß assimiliert wird.

Damit der Vorgang sich in dieser Geschwindigkeit vollziehen kann, ist Verwendung junger, andauernd von Tag zu Tag übergeimpfter Impfkulturen, ferner Zusatz von 0,1 % lediglich als Kolloid wirkendem Agar zur Nährlösung notwendig, weiterhin aber eine verhältnismäßig hohe Phosphatkonzentration, vor allem aber eine genügende Eisenversorgung.

Die optimale Eisenmenge ist je nach der Phosphatkonzentration und Phosphatpufferung etwas verschieden. Augenscheinlich ist die wirksame Zustands- oder Verteilungsform des Eisens weitgehend von der Phosphatgegenwart abhängig.

Bei geringen Eisenmengen kann Gegenwart von Calcium eine weitgehende Verschlechterung der Eisenversorgung des Bakteriums (durch Ausfällung und Adsorption) verursachen. Dest. Wasser ist zur Kultur infolgedessen weit besser geeignet als kalkhaltiges Leitungswasser.

Eine für das untersuchte Bakterium geeignete Nährlösung (Glucose 1 %, Glykokoll 0,1 %, K_2HPO_4/KH_2PO_4 0,10/0,52 %, $MgSO_4 . H_2O$ 0,01 %, $FeSO_4 . H_2O$ 0,01 %, Agar 0,1 %) ist für andere Mikroorganismen (*Aspergillus*, *Azotobacter*, *B. subtilis*) nicht optimal, insbesondere auch nicht hinsichtlich des Eisens.

Es wird an Hand der Literatur darauf hingewiesen, daß eine Glykokollwirkung nicht nur vom Gesichtspunkt der Stickstoff- (gegebenenfalls auch der Kohlenstoff-) Versorgung aus betrachtet werden darf, sondern daß noch Wirkungen anderer Art hinzukommen können.

Literatur.

E. Abderhalden u. *P. Rona*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 179, 1905. — *O. Acklin*, Biochem. Zeitschr. **164**, 312, 1925. — *E. Allison* u. *S. R. Hoover*, J. of Bact. **27**, 561, 1934. — *W. P. Allyn* u. *J. L. Baldwin*, ebenda **23**, 369, 1932. — *A. K. Anderson* u. *K. Emmart*, Plant Physiol. **9**, 823, 1934. — *T. Y. Kingma Boltjes*, diese Zeitschr. **6**, 79, 1935. — *H. Braun* u. *C. E. Cahn-Bronner*, Biochem. Zeitschr. **131**, 226, 272, 1922 (S. 253). — *H. Braun*, *A. Stamatelakis* u. *S. Kondo*, ebenda **145**, 381, 1924 (S. 392). — *H. Braun*, *A. Stamatelakis*, *S. Kondo* u. *R. Goldschmidt*, ebenda **146**, 573, 1924 (S. 579). — *F. Czapek*, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl., **2**. Jena, G. Fischer, 1920. — *L. E. den Dooren de Jong*, Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieprocess. Diss. Delft. Rotterdam, Niggh u. van Ditmar, 1926. — *H. Fitting*, Jahrb. f. wiss. Bot. **78**, 319, 1933 (dort auch frühere Arbeiten). — *Cl. Fromageot* u. *E. L. Piret*, diese Zeitschr. **7**, 551, 1936. — *G. Giesberger*, Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum Ehbg.* Diss. Delft, W. D. Meinema, 1936. — *R. Gistl*, diese Zeitschr. **7**, 177, 1936. — *E. Glinka-Tschernorutzky*, Biochem. Zeitschr. **263**, 144, 1933. — *Fr. S. Hammett*, Protoplasma **23**, 326, 1935. — *Fr. S. Hammett* u. *M. L. Elliot*, ebenda S. 457. — *Fr. S. Hammett* u. *N. Chatalbash*, ebenda S. 492. — *H. Heigener*, Centralbl. f. Bakt. II, **93**, 81, 1935. —

H. H. Hochapfel, ebenda **64**, 174, 1925. — *S. Kondo*, Biochem. Zeitschr. **158**, 302, 1924. — *J. Kořinek* u. *J. Babička*, Centralbl. f. Bakt. II, **95**, 42, 1936. — *A. P. Kriuchkowa* u. *E. V. Popowa*, Microbiology (russ.) **4**, 603, 1935; engl. Zusammenfassung S. 610. — *S. Levensen*, Ann. Inst. Pasteur **56**, 634, 1936. — *F. Lieben*, Biochem. Zeitschr. **132**, 180, 1922. — *F. Lieben* u. *B. Bauminger*, Anz. Akad. d. Wiss., Wien, Math.-naturwiss. Kl. 72, 166, 1935. — *F. Lieben* u. *H. Molnar*. ebenda S. 56. — *O. Meyerhof* (1). Pflügers Arch. **164**, 353; **165**, 229, 1916; **166**, 1917. — *Derselbe* (2), Biochem, Zeitschr. **162**, 43, 1925. — *O. Meyerhof* (3), *K. Lohmann* u. *R. Meier*, ebenda **157**, 459, 1925. — *H. W. Nicolai*, ebenda **179**, 86, 1926. — *N. Nielsen*, C. r. Lab. Carlsberg, Ser. physiol. **21**, 395, 1936. — *W. Ochmann*, Centralbl. f. Bakt. II, **86**, 458, 1932. — *S. Orla-Jensen*, ebenda **94**, 460, 1936. — *K. Pirschle*, Biochem. Zeitschr. **218**, 412, 1930. — *L. K. Pulkki*, Ann. Acad. Scient. Fennicae, Ser. A, **41**, Nr. 1, 1935. — *K. Puriewitsch*, Biochem. Zeitschr. **88**, 1, 1911. — *A. Rippel* (1), diese Zeitschr. **7**, 210, 1936. — *Derselbe* (2), ebenda **7**, 590, 1936. — *A. Rippel* u. *U. Stoess*, ebenda **3**, 492, 1932. — *W. Ruhland*, Jahrb. f. wiss. Bot. **63**, 321, 1924. — *G. Schwabe*, Protoplasma **16**, 397, 1932. — *C. Stapp*, Centralbl. f. Bakt. II, **51**, 1, 1920. — *R. A. Steinberg*, Amer. J. of Bot. **6**, 330, 1919. — *J. Supniewski*, Biochem. Zeitschr. **154**, 98, 1924. — *G. Thompson*, J. Agr. Res. **45**, 149, 1932. — *D. W. Thorne* u. *R. H. Walker*, Soil Sc. **42**, 301, 1936. — *F. Wagner*, Centralbl. f. Bakt. II, **93**, 359, 1935 36. — *S. A. Waksman* u. *S. Lomanitz*, J. Agr. Res. **30**, 263, 1925. — *M. Webster*, J. of biol. Chem. **114**, 265, 1936. — *W. Zaleski* u. *D. Pjukow*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **32**, 479, 1914. — *H. Zeller*, Biochem. Zeitschr. **176**, 134, 1926.

(Aus dem Bakteriologischen Institut der preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel.)

Untersuchungen über das Fettbildungsvermögen bei Pilzen der Gattung Oospora Wallroth (em. Sacc.)*.

Von

Hans Geffers.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Januar 1937.)

Untersuchungen über die Mengen des durch niedere Pilze *(Phycomyceten, Ascomyceten* und *Fungi imperfecti)* gebildeten Fettes sind sehr zahlreich. Schon die Tatsache, daß sich sehr häufig im Pilzmycel neben anderen Plasmastoffen eine Menge Fett in Form von kleineren oder größeren Tröpfchen vorfindet, gab Anlaß zu näheren Untersuchungen.

Bereits 1879[1] machte *Nägeli* (36) ausführliche Angaben über die Fettbildung bei niederen Pilzen und stellte fest, daß in Ruhezuständen der Fettgehalt sehr hoch sein kann. Auch *de Bary* (3) fand 1884, daß in Ruhezuständen Pilzzellen bis zu 50% Fett der Trockenmasse zu speichern vermögen.

Der Gehalt an Fett oder besser an Lipoiden, worunter alle organischen, in Äther, Petroläther und gegebenenfalls noch die in Alkohol löslichen Stoffe verstanden sind, kann sehr hoch sein. So zeigten die Untersuchungen *Lindners* (30) an einem aus dem Milchfluß von Ahorn isolierten Pilz *Endomyces vernalis Ludwig*, daß das Fett in den Zellen fast die Hälfte der Trockensubstanz ausmachen kann. *Endomyces* bildete an Fett bis zu 44,72% der Trockensubstanz. Auch bei *Penicillium glaucum* fand *Kramer* (20) bis 50% Fett in der Trockensubstanz, da der von ihm gemachte Äther-Alkoholextrakt wohl zum größten Teil aus Fett bestanden haben dürfte. Nach *Laborde* (22) beträgt die Fettbildung bei *Eurotiopsis Gayoni* bis zu 29,8% der Trockensubstanz, und *Perrier* (38) fand noch höhere Werte (bis zu 34,05% der Trockensubstanz). *Marschall* (33) fand bei *Aspergillus niger* 23,2%, bei *Mucor stolonifer* 18,8% und bei *Penicillium glaucum* 15,9% Fett (Äther-Alkoholextrakt). Nach den Untersuchungen von *Ward, Lockwood* und *Herrik* bildete *Aspergillus* bis zu 15,0% Fett in der Trockensubstanz, *Penicillium* bis zu 41,5%.

Auch Versuche, diese relativ großen Fettmengen der Pilze industriell auszunutzen, sind oft gemacht, besonders in Zeiten allgemeiner Fettknappheit.

Die ersten Untersuchungen hierüber stellte 1915 auf Anregung von *Delbrück* (9) *P. Lindner* an. Es wurden zuerst *Hefen*, dann auch *Endomyces*

---

* Dissertation der Philosophischen Fakultät Kiel (Prof. *Henneberg* †).

[1] Bei den folgenden Literaturangaben sind nur quantitative Erhebungen berücksichtigt.

vernalis Ludwig auf Fettbildungsvermögen geprüft. Auf Grund dieser wissenschaftlichen Untersuchungen erschien dann eine ganze Anzahl von Patenten (21) auf die industrielle Verwertung des Fettbildungsvermögens von Pilzen in der Zeit des Weltkrieges und kurz danach, die Patente: DRP. 305091, Klasse 53 h; 306365, Klasse 53 h; 307789, Klasse 53 h; 309266, Klasse 53 h; 310616, Klasse 53 h; 320560, Klasse 53 h; 332411, Klasse 53 h.

Hierbei handelte es sich meistens um Verfahren, das Fett von *Endomyces*, *Sachsia* und *Hefen* nach Züchtung auf Sulfitlauge, Rübenmelasse. Abkochungen zuckerhaltiger Früchte oder Molke zu gewinnen.

Auch von amerikanischer Seite wurde versucht, das Fett von Schimmelpilzen industriell zu verwerten. *Ward*, *Lockwood*, *May* und *Herrik* (51) untersuchten 61 Schimmelpilze auf ihr Fettbildungsvermogen. Die Kultur fand in großen flachen Schalen statt, die mit 20 Liter einer Nährflüssigkeit gefüllt waren. Die Fettbildung war besonders gut bei *Penicillium*-Arten; mit *Endomyces* wurde nicht gearbeitet.

Anlaß zu den hier vorliegenden Untersuchungen gab das mehrfach beobachtete, massenhafte Vorkommen von stark verfetteten Mycelfäden und Einzelzellen in Senkgruben und in Abwasserreinigungsanlagen von Molkereien.

Damm (7) beobachtete ein derartiges Vorkommen von verfettetem Mycel in Abwasseranlagen, die mit so großen Mengen von Milchresten und Molke beschickt waren, daß eine Reinigung des Abwassers nicht mehr eintrat. In den Absetzbecken trat infolge des hohen Milchzuckergehaltes der zugeführten Molke eine Sauerung durch Milchsaurebakterien ein, wahrend es, nach Verdünnung des Abwassers im Vorfluter, infolge des hohen Eiweißgehaltes zu einer stark stinkenden Faulnis kam.

Bei Untersuchungen dieses Abwassers zeigten sich im mikroskopischen Praparat verfettete Mycelfäden und ovale bis gestreckte, mit abgerundeten Enden versehene Zellen, die besonders stark fetthaltig waren. Daneben fanden sich sehr viele Milchsaurebakterien und *Bacterium coli*. Die Reaktion des Abwassers war schwach sauer, was auf das Vorkommen der Milchsaurebakterien zurückzuführen ist.

In meinen Untersuchungen galt es festzustellen, 1. welcher Art die hier Fett speichernden Pilze angehörten, und 2. wie groß die Menge des unter verschiedenen Kulturbedingungen entstehenden Fettes maximal werden kann, und zwar unter Kulturbedingungen, wie sie für eine technische Ausnutzung anwendbar wären.

Aus diesen Gründen kam als Nahrmedium ausschließlich Molke in Frage, die trotz hoher Nahrstoffkonzentration auch heute noch vielfach nicht zu verwenden ist, und die deshalb häufig in die Abwasserklaranlagen eingeleitet wird, wo sie, in großen Mengen zugeführt, durch die eintretende Säuerung eine Reinigung des Abwassers unmöglich macht. Selbstverständlich wurde bei diesen Untersuchungen über die maximale Fettbildung auch möglichst der Einfluß der verschiedenen Bedingungen auf die Menge des gebildeten Fettes festgestellt.

Über die Rentabilität einer derartigen technischen Ausnutzung wurden keine Untersuchungen angestellt, da hierüber nicht der Laboratoriumsversuch, sondern allein der — wenn auch nur im kleinen Maßstab angestellte — Fabrikversuch entscheiden kann.

I. Morphologie, Systematik und Physiologie der zu den Versuchen benutzten Oospora-Stämme.

Beim Übertragen von einzelnen Mycelstücken aus dem Abwasser in Hängetröpfchenkulturen mit steriler Molke zeigte sich, daß die nicht allzu stark verfetteten Zellen auskeimten und daß das ausgekeimte Mycel nach etwa 24 Stunden in einzelne Oidien zerfiel, die sich teilweise abrundeten.

Da andere Vermehrungsformen nicht festzustellen waren, handelte es sich bei den untersuchten Pilzen also um Angehörige der *Oosporeae*.

Diese Pilzgruppe gehört nach *Janke* (17), der mit *Sorauer* und *Wollenweber* (49) und mit *Rabenhorst* (39) im wesentlichen übereinstimmt, zu den *Fungi imperfecti*, und zwar zu den *Hyphomycetes* und zur Gattung *Oospora Wallroth, em. Sacc.*

Janke (17) unterscheidet in der Gattung *Oospora* zwei Typen, den Typ a, Gärungsmonilien, die neben Zerfall in Oidien noch Vermehrung durch hefeartige Sprossung zeigen, und den Typ b, Milchschimmel, ohne Sprossung, nur Zerfall in Oidien zeigend.

Die hier untersuchten Stämme gehörten, wie auch aus späteren Untersuchungen hervorging, samtlich zum Typ b. Einige Stämme zeigten jedoch starke Ähnlichkeit in der Gelatinekolonie mit dem Typ a, von dem sie sich aber durch das Fehlen des Gärungs- und Sprossungsvermögens unterschieden; auch zeigten diese Stämme gewisse Ähnlichkeit mit der *Oosporeen*-Gattung *Monilia Pers., em. Sacc.*

Der früher für die Gattung *Oospora* vielfach angewandte Name *Oidium Fres.* ist vom systematischen Standpunkt aus nicht zu halten, da er schon für die mit Haustorien versehene *Oosporeen*-Gattung *Oidium Link, em. Sacc.*, die Konidienformen von *Erysipheen*, vergeben ist, weshalb auch in dieser Arbeit von der Gattungsbezeichnung *Oidium* Abstand genommen worden ist.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden *Oospora*-Stämme verschiedenster Herkunft isoliert. Eine Übersicht über diese Stämme gibt Tabelle I (S. 69–73). Berücksichtigt sind in dieser Tabelle die morphologischen Eigenschaften und einige physiologische Leistungen wie Fettbildung, Fettspaltung und Eiweißabbau in Milch.

Die Bestimmung der Stämme erfolgte gegen Abschluß der Arbeit noch einmal. Es zeigte sich, daß in der Zwischenzeit keine morphologischen und physiologischen Veränderungen eingetreten waren. Stamm 2 und 8 erwiesen sich im Laufe der Untersuchungen als identisch mit anderen Stämmen und wurden deshalb aus der Liste gestrichen.

In Tabelle I werden folgende Merkmale berücksichtigt:

A. Morphologische (1—4):

1. Zellverband, Mycelbildung, mittlere Mycelgröße und Oidiengröße wurden untersucht in Federstrichkulturen nach *Henneberg* (16). Als Nahrmedium fand, ebenso wie in allen späteren Untersuchungen, sterile Magermilchmolke Verwendung.

2. Hautbildung auf Molke, 50 ccm in Kulturflaschen von 4,0 cm Durchmesser; p_H 5,5.
3. Kolonieform auf Würzegelatine, Würze 8° Balling, Gelatinekonzentration 20%. Durchmesser der Kolonie nach 10 Tagen gemessen.
4. Gruppeneinteilung nach *Ritter* (42). Die Ähnlichkeit der Gelatinekolonie mit *Monilia Pers.* ist mit „*M*" bezeichnet, die mit *Oidium Fres.* mit „*L*".

B. Physiologische (5–7):
5. Fettbildungsvermögen in Federstrichkulturen mit Magermilchmolke untersucht.
6. Fettspaltungsvermögen im Federstrich mit Vollmilchbouillon (1 Teil Vollmilch + 2 Teile Bouillon).
7. Eiweißabbau in steriler Magermilch in Reagensröhrchen. Der Abbau wurde nach der Aufhellung der Milch beurteilt:

Kein Abbau	— keine sichtbare Veränderung.
Geringer Abbau	— leichte noch trübe Aufhellung der Milch von oben her.
Guter Abbau	— eine etwa 1 cm breite helle, durchsichtige Schicht von aufgelöster Milch.
Starker Abbau	— eine etwa 2 bis 3 cm breite helle Schicht.
Sehr starker Abbau	— fast vollständige Aufhellung bis auf geringere Reste am Boden der Kultur.

Der Eiweißabbau wurde nach 20 Tagen beurteilt.

Über die Einteilung der *Oospora*-Stämme in die beiden Gruppen „*M*" und „*L*" ist zu sagen, daß sich alle in ausführlichen Arbeiten beschriebenen Oosporeen ohne Sproßvermögen in diese beiden Gruppen hinsichtlich ihres morphologischen und physiologischen Verhaltens einordnen lassen [*Schnell* (46), *Bobilioff-Preisser* (5), *Meubrink* (35), *Ritter* (42) und *Lembke* (25)].

Tabelle I.

Stamm 1. 1. Oidien länglich, eckig, 3 : 8 bis 5 : 12 μ; guter Zerfall in Oidien, wenig Mycel 4 : 40 bis 4 : 60 μ. — 2. Dünne, weiße, filzige Haut auf Molke. — 3. Feine radiäre, gerade Streifung. Ø 65 mm[1]. — 4. *Ritter* III b „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung gut. — 7. Kein Milcheiweißabbau.

Stamm 3. 1. Oidien oval-rund, 4 : 8 bis 5 : 10 μ; vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Dünne gefaltete Haut, fast farblos durchscheinend. 3. Fein hirnartig gefaltet. Ø 12 mm. — 4. *Ritter* IIa „*M*". — 5. Viel Fett. — 6. Fettspaltung schlecht. 7. Milcheiweißabbau gut.

Stamm 4. 1. Oidien länglich, abgerundet, 4 : 12 bis 5 : 18 μ; vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Hautbildung fehlt, nur Mycelflocken. Vergleiche *Stamm 10.* — 3. Breite hirnartige Faltung. Ø 14 mm. — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Mittelgute Fettbildung. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Starker Milcheiweißabbau.

Stamm 5: 1. Oidien oval-rund, 5 : 10 bis 6 : 10 μ; vollständiger Zerfall in Oidien. — 2. Dicke derbe Haut mit breiten hirnartigen Falten. — 3. Grob hirnartig gefaltete Kolonie. Ø 15 mm. — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Fettbildung gut. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Sehr starker Milcheiweißabbau.

---

[1] Ø bedeutet Durchmesser.

Stamm 6: 1. Oidien länglich, abgerundet, 4 : 7 bis 6 : 10 μ; das ganze Mycel ist in Oidien zerfallen. — 2. Dicke, weiße, watteartige Oberfläche der Haut, sonst strukturlos ohne Falten. — 3. Kolonie weiß, Mitte nicht erhaben, strukturlos, Rand leicht gezähnt. Ø 64 mm. — 4. *Ritter* IV „*L*". — 5. Fast keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung sehr stark. — 7. Geringer Eiweißabbau.

Stamm 7: 1. Oidien rundlich oval, 4 : 5 bis 5 : 8 μ; vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Dicke feingefaltete Haut mit schmalem Rand am Glase des Kulturgefäßes. — 3. Fein hirnartig gefaltete Kolonie von hellgelber Farbe. Ø 12 mm (Abb. 1). — 4. *Ritter* IIa „*M*". — 5. Sehr gute Fettbildung. — 6. Keine Fettspaltung. — 7. Starker Eiweißabbau.

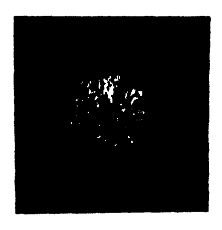


Abb. 1. *Oospora 7.* nat. Größe.

Stamm 9. 1. Oidien zylindrisch, wenig abgerundet, 5 : 10 bis 5 : 18 μ; Mycelfäden gut ausgebildet, 5 : 40 μ. — 2. Geringe dünne, filzige Hautbildung. — 3. Weiße radiär gestreifte Kolonie. Ø 57 mm. — 4. *Ritter* IIIb „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung gut. — 7. Kein Eiweißabbau.

Stamm 10: 1. Oidien länglich, abgerundet, 4 : 12 bis 5 : 18 μ; Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Keine Hautbildung, Mycel nur in untergetauchten Flocken. Vergleiche *Stamm 4.* — 3. Kolonie fein hirnartig gefaltet. Ø 14 mm. — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Gute Fettbildung. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Sehr starker Eiweißabbau.

Stamm 11: 1. Oidien länglich oval, abgerundet, 5 : 12 bis 5 : 18 μ; Mycel vollkommen in Oidien zerfallen. — 2. Dicke Haut mit engen hirnartigen Falten. — 3. Kolonie mit breiten hirnartigen Falten. Ø 13 mm. — 4. *Ritter* IIa „*M*". — 5. Gute Fettbildung. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Starker Eiweißabbau.

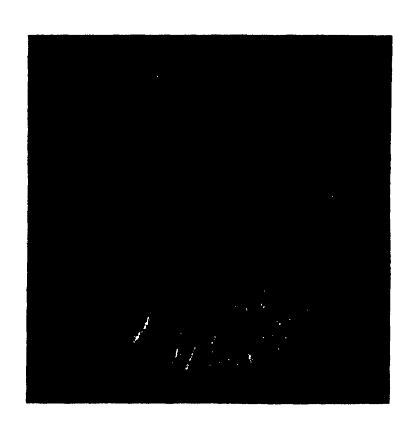


Abb. 2. *Oospora 12.* nat. Größe.

Stamm 12. 1. Oidien rundlich oval, 4 : 5 bis 5 : 8 μ; Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut dünn, farblos, glänzend. Sinkt leicht unter. — 3. Kolonie wellig radiär gefaltet mit hirnartiger Mitte. Farblos, durchscheinend. Ø 40 mm (Abb. 2). — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Sehr gute Fettbildung. — 6. Keine Fettspaltung. — 7. Eiweißabbau sehr stark.

Stamm 13. 1. Oidien wenig abgerundet, eckig, 4 : 10 bis 6 : 16 μ. Stark verzweigtes Mycel, wenig in Oidien zerfallen. — 2. Haut rein weiß, watteartig. — 3. Kolonie weiß, radiär gestreift. Ø 62 mm. — 4. *Ritter* IIIb „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Gute Fettspaltung. — 7. Geringer Eiweißabbau.

Stamm 14: 1. Oidien rundlich oval, abgerundet. Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut derb, enge hirnartige Falten, weiß-gelblich. — 3. Kolonie weißlich gelb, fein hirnartig gefaltet. — Ø 14 mm. — 4. *Ritter* IIa „*M*". — 5. Fettbildung sehr gut. — 6. Keine Fettspaltung. — 7. Eiweißabbau sehr stark.

Stamm 15: 1. Oidien länglich oval, 6 : 10 bis 6 : 14 μ. Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut breit hirnartig gefaltet. — 3. Hirnartige Form mit breiten Falten, weißlich gelb gefärbt. ∅ 13 mm. — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Fettbildung sehr gut. — 6. Fettspaltung ganz gering. — 7. Milcheiweißabbau sehr stark.

Stamm 16: 1. Oidien lang oval, 5 : 10 bis 6 : 18 μ. Vollständiger Zerfall des Mycels in Oidien. — 2. Haut grob hirnartig gefaltet. — 3. Kolonie breit hirnartig gefaltet. ∅ 12 mm. Abb. 3. — 4. *Ritter* IIb „*M*". 5. Fettbildung sehr gut. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Eiweißabbau stark.



Abb. 3. *Oospora 16*, nat. Größe

Stamm 17: 1. Oidien wenig abgerundet, eckig, 4 : 10 bis 4 : 12 μ. Mycel nur teilweise in Oidien zerfallen. Mycel 4 : 40 bis 4 . 50 μ. — 2. Hautbildung glatt, wattig, weiß, strukturlos; sinkt nicht unter. — 3. Kolonie mit spiralig gebogenen Radien. ∅ 71 mm. Abb. 4. — 4. *Ritter* IIIc „*L*". 5. Fettbildung nicht vorhanden. — 6. Fettspaltung sehr stark. — 7. Eiweißabbau gering.

Stamm 18: 1. Oidien ähnlich *Stamm 17*. — 2. Hautbildung wattig weiß. — 3. Kolonie mit spiralig gebogenen Radien, breiter als bei *Stamm 17*. Schneller wachsend. ∅ 81 mm. Im übrigen *Stamm 17* sehr ähnlich. — 4. *Ritter* IIIc „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung sehr gut. — 7. Eiweißabbau gering.

Stamm 19: 1. Oidien rund oval, 5 : 10 bis 6 : 13 μ. Vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut glatt, strukturlos, leicht untersinkend. — 3. Kolonie weiß, strukturlos mit etwas erhöhter Mitte. ∅ 61 mm. — 4. *Ritter* IV „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung gut. — 7. Eiweißabbau gering.

Stamm 20. 1. Oidien oval, 5 : 9 bis 5 : 12 μ. Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut glatt, strukturlos, teilweise untergetaucht. — 3. Glatte, strukturlose Kolonie mit erhabener Mitte. ∅ 60 mm. — 4. *Ritter* IV „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung sehr stark. — 7. Eiweißabbau gering.



Abb. 4. *Oospora 17*. 1/2 nat. Größe

Stamm 21: 1. Oidien rund oval, 4 : 5 bis 7 : 10 μ. Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut dünn strukturlos, leicht reißend und untersinkend. — 3. Kolonie mit wellenförmigen radiären Falten, die Mitte ist hirnartig gefaltet. Oberfläche der Kolonie feucht glänzend. ∅ 38 mm. — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Fettbildung sehr gut. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Eiweißabbau gut.

Stamm 22. 1. Oidien zylindrisch, abgerundet. Mycel noch vorhanden. Oidien 6 . 10 bis 8 : 12 μ. Mycel 7 : 40 μ. — 2. Haut weißlich gelb, strukturlos. — 3. Kolonie weiß, radiär gestreift. ∅ 66 mm. — 4. *Ritter* IIIa „*L*". — 5. Kein Fett. — 6. Gute Fettspaltung. — 7. Kein Eiweißabbau.

Stamm 23: 1. Oidien zylindrisch, abgerundet, 4 : 6 bis 4 : 10 μ. Mycel noch vorhanden 4 : 25 μ. — 2. Haut weiß, glatt, strukturlos. — 3. Weiße, radiär gestreifte Kolonie. ∅ 62 mm. — 4. *Ritter* IIIb „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung gut. — 7. Kein Eiweißabbau.

Stamm 24: 1. Mycel vollständig in Oidien zerfallen, 4 : 5 bis 5 : 7 μ. — 2. Haut weiß, wattig, glatt. — 3. Radiär gestreifte Kolonie. ∅ 62 mm. — 4. *Ritter* IIIb „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung sehr gut. — 7. Eiweißabbau gering.

Stamm 25: 1. Oidien zylindrisch, abgerundet, 5 : 8 bis 6 : 10 μ. Mycel 4 : 80 μ. — 2. Haut weiß, wattig, glatt. — 3. Radiär gestreifte Kolonie, weißlich gelb. ∅ 64 mm. — 4. *Ritter* IIIb „*L*". — 5. Fettbildung fehlt. — 6. Fettspaltung gut. — 7. Kein Eiweißabbau.

Stamm 26: 1. Oidien zylindrisch, abgerundet, 5 : 8 bis 6 : 10 μ. Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut dünn, farblos, leicht untersinkend. — 3. Oberfläche der Kolonie glatt, strukturlos, durch Verflüssigung der Gelatine leicht feucht werdend. ∅ 66 mm. — 4. *Ritter* I „*L*". — 5. Fett-

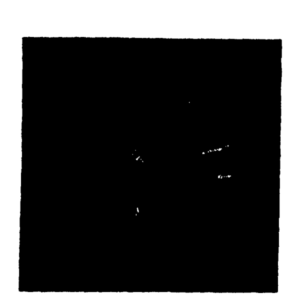


Abb. 5. *Oospora 27*, nat. Größe

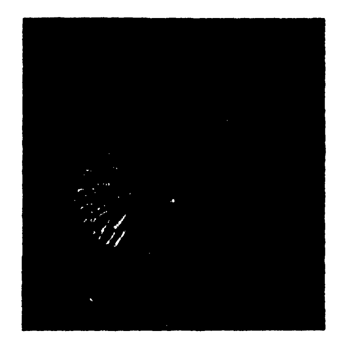


Abb. 6. *Oospora 28*, ½ nat. Größe

bildung nicht vorhanden. — 6. Fettspaltung sehr stark. — 7. Kein Eiweißabbau.

Stamm 27: 1. Mycel vollkommen in Oidien zerfallen, 3 : 5 bis 4 : 6 μ. — 2. Weiße, breit hirnartig gefaltete Haut. — 3. Gelblich weiße Kolonie mit breiter radiärer Faltung und hirnartiger Mitte. ∅ 27 mm (Abb. 5). 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Sehr gute Fettbildung. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Sehr starker Eiweißabbau.

Stamm 28: 1. Oidien zylindrisch, abgerundet, 5 : 8 bis 6 : 13 μ. Nur wenig Mycel ist in Oidien zerfallen, Mycel 4 : 16 μ. — 2. Hautbildung weiß, wattig, leicht gewellt. — 3. Weiße radiär gestreifte, dick filzige Kolonie. ∅ 58 mm (Abb. 6). — 4. *Ritter* IIIa „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Gute Fettspaltung. — 7. Geringer Eiweißabbau.

Stamm 29: 1. Oidien zylindrisch, eckig, 4 : 7 bis 4 : 10 μ. Mycelzellen 4 : 40 μ. — 2. Hautbildung dick, weiß, wattig. — 3. Weiße Kolonie mit geraden Streifen. ∅ 60 mm. — 4. *Ritter* IIIa „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Sehr gute Fettspaltung. — 7. Kein Eiweißabbau.

Stamm 30: 1. Oidien zylindrisch, abgerundet, 6 : 8 bis 7 : 13 μ. Mycel vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Hautbildung dünn farblos, zerbrechlich. — 3. Kolonieoberfläche strukturlos, farblos durch frühe Gelatineverflüssigung. Vergleiche *Stamm 26*. ∅ 65 mm. — 4. *Ritter* I „*L*". — 5. Fettbildung ganz gering. — 6. Fettspaltung sehr stark. — 7. Eiweißabbau ganz gering.

Stamm 31: 1. Oidien zylindrisch, abgerundet, 4 : 6 bis 5 : 7 μ, Mycel ist noch vorhanden, 4 : 34 μ. — 2. Hautbildung dünn, farblos, mit glatter Oberfläche. — 3. Kolonie farblos, feucht glänzend. ∅ 68 mm. — 4. *Ritter* I

„*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung sehr gut. — 7. Eiweißabbau gering.

Stamm 32: 1. Oidien oval bis rund, 3 : 5 bis 4 : 6 μ. Das Mycel ist vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Hautbildung dick, breit hirnartig gefaltet. — 3. Kolonie weiß, breit radiär gefaltet mit hirnartiger Mitte. ∅ 27 mm (Abb. 7). — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Sehr gute Fettbildung. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Eiweißabbau sehr stark.

Stamm 33: 1. Oidien sehr variabel in Form und Größe, zylindrisch, abgerundet, 3 : 5 bis 6 : 8 μ. Vollständig in Oidien zerfallen. — 2. Haut weiß, wattig, mit glatter Oberfläche. ∅ 64 mm. — 3. Kolonie weiß strukturlos, ohne erhabene Mitte — 4. *Ritter* IV „*L*". — 5. Keine Fettbildung. 6 Fettspaltung sehr stark. — 7. Eiweißabbau gering.



Abb. 7 *Oospora 32*, nat Größe

Stamm 34: 1. Oidien länglich oval, 4 . 6 bis 5 : 12 μ. Vollständig in Oidien zerfallen — 2. Haut dünn, leicht untergetaucht, farblos. — 3. Kolonie hirnartig gefaltet, Mitte erhöht, feucht glänzend, farblos, ∅ 40 mm. — 4. *Ritter* IIb „*M*". — 5. Sehr gute Fettbildung. — 6. Fettspaltung schlecht. — 7. Eiweißabbau stark

Stamm 35 1. Mycel 4 : 30 μ, fast vollständig in Oidien zerfallen. Oidien länglich oval, 4 : 5 bis 4 : 6 μ — 2. Haut weiß wattig, strukturlos. — 3 Kolonie weiß, wattig, strukturlos. Mitte nicht erhaben. ∅ 60 mm. — 4. *Ritter* IV „*L*". — 5. Fettbildung fehlt. — 6. Fettspaltung sehr stark. — 7. Eiweißabbau gering.

Stamm 36: 1. Mycel 4 : 60 μ, fast ganz in Oidien zerfallen. Oidien zylindrisch, abgerundet, 4 : 6 bis 5 : 8 μ. — 2. Haut weiß, watteartig, dick mit glatter Oberfläche. 3. Kolonie schwach radiär gestreift. ∅ 63 mm. — 4. *Ritter* IIIa „*L*". — 5 Keine Fettbildung — 6. Fettspaltung gut. 7. Eiweißabbau gering.

Stamm 37 · 1. Das ganze Mycel ist in kleinzellige Oidien zerfallen, 4 : 5 bis 4 : 6 μ. 2. Haut farblos, leicht untergetaucht. — 3. Kolonie breit hirnartig gefaltet, feucht glänzend, farblos. ∅ 34 mm. — 4. *Ritter* IIb „*M*". 5. Fettbildung vorhanden, aber nicht stark. — 6. Fettspaltung gering. — 7. Eiweißabbau gut.

Stamm 38: 1. Das Mycel ist vollständig in Oidien zerfallen 4 . 6 bis 5 : 8 μ. — 2. Haut dünn, weiß, filzig. — 3. Kolonie radiär gestreift, Radien leicht wellenförmig. ∅ 64 mm. — 4. *Ritter* IIIb „*L*". — 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung gut. — 7. Kein Eiweißabbau.

Stamm 39: 1. Mycel 4 : 60 μ, fast ganz in Oidien zerfallen. Oidien zylindrisch, abgerundet, 5 : 8 bis 5 : 10 μ. — 2. Haut weiß, dick watteartig. — 3. Kolonie schwach radiär gestreift, Radien gerade. ∅ 63 mm. — 4. *Ritter* IIIa „*L*". 5. Keine Fettbildung. — 6. Fettspaltung sehr stark. — 7. Geringer Eiweißabbau.

Die zwei von mir in dieser Tabelle unterschiedenen Gruppen von *Oospora Wallr.* erwiesen sich noch im Laufe der weiteren Untersuchungen als scharf voneinander getrennt. Zusammenfassend konnte schon jetzt über diese beiden Gruppen gesagt werden:

Gruppe „M": Kolonieform ähnlich *Monilia Pers., em. Sacc.* Gute Fettbildung, schlechte Fettspaltung. Starker Eiweißabbau in Milch.

Gruppe „L“: Kolonieform ähnlich *Oidium lactis Fres.* Keine Fettbildung, gute Fettspaltung. Geringer Eiweißabbau in Milch.

In diesem Zusammenhang erscheint eine Beobachtung von *Mellanby* (34) interessant, der feststellte, daß durch tryptische Fermente Lipasen in ihrer Wirkung gehemmt werden.

Wenn man nun mit *Lembke* (25) annimmt, daß sich tryptische und lipatische Fermente im Zellinnern ebenso verhalten, so kann man das Auftreten größerer Fettmengen im Zellinnern so erklären, daß die durch den Stoffwechsel der Zelle gebildeten Lipoide infolge der starken Erzeugung von tryptischen Fermenten nicht oder nur schwer wieder abgebaut werden können. Auf diese Weise könnte es dann in den Zellen mit hohem Gehalt an tryptischen Fermenten zu einer Fettspeicherung kommen, die zu einer Degeneration (Überfettung) und zum Absterben der Zelle führen könnte, wie das bei den Stämmen der Gruppe *Ritter* IIa und IIb und Gruppe „*M*“ der Fall ist. Wenn nur wenig tryptische Fermente vorhanden sind, kann das gebildete Fett im weiteren Wachstumsverlauf sogleich wieder durch die nicht gehemmte Lipase abgebaut werden, und es kommt so nicht zu einer Fettspeicherung. Dies könnte der Fall sein bei den Stämmen der Gruppe *Ritter* I, IIIa, IIIb, IIIc, IV und Gruppe „*L*“.

Indessen könnte eine geringe Fettbildung auch durch das Fehlen geeigneter Kohlenhydrate bedingt sein, oder dadurch, daß die vorhandenen Kohlenhydrate nicht ausgenutzt werden können.

II. Untersuchungsmethoden.

Die Methode der Trockensubstanzbestimmung.

Um ein Maß für die Menge des gebildeten Mycels zu erhalten, wurde die Trockensubstanz bestimmt. Hierzu wurde das Mycel vom Nährmedium (Molke) durch Filtration getrennt, dann zwecks Säuberung von noch anhaftender Molke auf dem Filter mehrmals mit dest. Wasser gewaschen und bei geeigneter Temperatur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bei der Prüfung von Filtern auf Brauchbarkeit gelang eine restlose Trennung von Mycel und Nährmedium ohne weiteres mittels *Seitz*-Filter unter Anwendung eines Unterdruckes von 12 bis 15 mm Hg, es trat jedoch leicht ein Verstopfen der Filterporen beim Filtrieren großerer Mycelmengen ein. Infolgedessen erfolgte die Filtration sehr langsam, und das Auswaschen des Mycels war nur unvollständig zu erreichen.

Eine restlose Trennung mittels Filtrierpapier gelang nicht, stets gingen einzelne Oidien mit durch das Filter; diese wurden also bei der Trockensubstanzbestimmung nicht mit erfaßt. Um nun ein Maß für die Größe dieses Verlustes zu erhalten, wurde folgender Versuch angestellt:

Je 500 ccm Molke wurden in 1 Liter Kochflaschen sterilisiert und mit *Oospora* beimpft. Die Kulturen blieben 10 Tage bei 18 bis 20° C stehen und wurden täglich einmal kräftig geschüttelt, um eine Deckenbildung zu vermeiden und einen weitgehenden Zerfall in Oidien zu begünstigen. Nun wurden je 10 ccm mittels Papierfilter filtriert und die Keimzahl auf Würzeagar vor und nach dem Filtrieren bestimmt. Als Filter wurden gefaltete Rundfilter oder Faltenfilter von *Schleicher & Schüll* benutzt.

Untersucht wurden Rundfilter Ø 12,5 cm Nr. 595 und Nr. 597, Geh. Filter Ø 12,5 cm Nr. 575, Aschefreie Filter Ø 12,5 cm Nr. 589_1, Nr. 589_2, Nr. 589_3 und Faltenfilter Ø 12,5 cm Nr. 588.

Es wurden die sechs *Oospora*-Stämme *9, 13, 14, 16, 27* und *32* untersucht. Nur die Untersuchungsergebnisse der Stämme *9* und *27* sind hier in Tabelle II mitgeteilt, da die Ergebnisse bei *9* und *13* einerseits und bei *14, 16, 27* und *32* andererseits untereinander sehr ähnlich waren.

Tabelle II. Der durch Filtration entstehende Verlust bei Verwendung verschiedener Filter.

Filter Nr.	Versuch mit *Oospora 27*. Anfangskeimzahl 1220 . 10^4/ccm		Versuch mit *Oospora 9*. Anfangskeimzahl 400 . 10^4/ccm	
	Keimzahl ccm im Filtrat	Verlust in % der Gesamtkeimzahl	Keimzahl ccm im Filtrat	Verlust in % der Gesamtkeimzahl
595	23,1 . 10^4	1,90	14,2 . 10^4	3,55
597	4,2 . 10^4	0,34	3,2 . 10^4	0,80
575	1,5 . 10^4	0,12	1,0 . 10^4	0,25
589_1	45,0 . 10^4	3,70	24,1 . 10^4	6,03
589_2	3,0 . 10^4	0,25	2,0 . 10^4	0,50
589_3	0,2 . 10^4	0,02	0,1 . 10^4	0,03
588	4,0 . 10^4	0,33	2,8 . 10^4	0,70

Berücksichtigt man, daß nur einzelne Oidien, nicht aber größere Mycelstücke durch das Filter gehen, so kommt man zu dem Ergebnis, daß bei der Trockensubstanzbestimmung ein Verlust entsteht, der in Prozenten der Trockensubstanz höchstens die Hohe des Verlustes in Prozenten der Gesamtkeimzahl erreichen kann.

Die Filtrationsgeschwindigkeit bei den Filtern Nr. 575, 589_2 und 589_3 war langsamer als die von Filter Nr. 588. Unter Berücksichtigung der Filtrationsgeschwindigkeit kamen daher für alle folgenden Versuche Faltenfilter Nr. 588 zur Verwendung, bei deren Verwendung also nur ein Verlust entstand, der bei *Oospora Nr. 27* maximal 0,33 %, bei *Oospora Nr. 9* maximal 0,70 % der Gesamttrockensubstanz betrug.

Bei Filtration von 50 und 100 ccm war der Verlust in Prozenten der Gesamtkeimzahl noch geringer, anscheinend wird ein Teil der weiteren Filterporen gleich zu Anfang des Filtrierens verstopft.

Der Fehler, der durch den Filtrationsverlust entsteht, ist demnach so gering, daß er für die folgenden Versuche unberücksichtigt bleiben kann.

Das Mycel wurde auf dem Filter mehrmals mit dest. Wasser gewaschen. Ungenügendes Waschen ist bei der nachfolgenden Trocknung bei 103° C stets an der dunkelbraunen Verfärbung zu erkennen, die großtenteils von dem Milchzucker der nicht ausgewaschenen Molke herrührt, der bei der Trocknung karamelisiert.

Das Mycel wurde bei 103° C getrocknet; eine höhere Temperatur erschien nicht angebracht, da hierbei das gebildete Fett sich leicht oxydieren konnte, was eine Gewichtserhöhung zur Folge gehabt hätte. Die Trockendauer bis zur Gewichtskonstanz betrug etwa 6 bis 12 Stunden.

Das getrocknete Mycel erwies sich als stark hygroskopisch. Um eine Gewichtszunahme zu verhindern, wurde das Filter in einem offenen Wäge-

glas im Trockenschrank getrocknet, im offenen Wägeglas im Exsikkator über Chlorcalcium 1 Stunde lang abgekühlt, und danach das Wägeglas mit geschlossenem Deckel gewogen.

Das Trocknen des Mycels wurde bis zur Gewichtskonstanz wiederholt. Auf diese Weise war es möglich, eine absolute Gewichtskonstanz zu erzielen. Das Wägegläschen hatte zweckmäßig eine schmale, hohe Form, die es erlaubte, das Faltenfilter aufrecht stehend zu trocknen (Durchmesser etwa 4,5 cm und Höhe 7,5 cm).

Die Methode der quantitativen Fettbestimmung.

Um das Fett aus pflanzlichem Material zu gewinnen, z. B. aus Ölsamen, Kakaobohnen und ähnlichem, wird dieses zunächst fein gemahlen und dann im *Soxhlet*-Apparat mit wasserfreiem Äther extrahiert.

Nach dieser allgemein gebräuchlichen Methode machte *Kramer* (20) seine Fettbestimmungen bei *Penicillium*, *Laborde* (22) bei *Eurotiopsis Gayoni*, *Perrier* (38) bei *Aspergillus* und *Citromyces* und *Lindner* (27) bei *Bier*- und *Bäckereihefen* und bei *Torula*.

Diese Methode sollte auch bei dem getrockneten und fein gemahlenem *Oospora*-Mycel verwendet werden.

Dabei zeigte sich jedoch, daß 1. die Extraktion des Fettes sehr langsam erfolgte, und daß 2. das Fett nicht restlos aus den getrockneten Zellen durch den Äther entfernt wurde.

Um die Extraktionsdauer zu bestimmen, wurde das Mycel bei 103° C hart getrocknet und in einem Porzellanmörser zerrieben, und, um eine weitgehende gleichmäßige Feinheit zu erhalten, das fein zerriebene Mycel durch Müllergaze (0,3 qmm) gesiebt. Die Dauer der Extraktion gibt Tabelle III wieder.

Tabelle III.

Mycelmenge	1010 mg	%	1045 mg	%
Fett nach 3 Std.	58 mg	5,7	60 mg	5,7
„ „ 7 „	70 „	6,9	75 „	7,2
„ „ 11 „	76 „	7,5	80 „	7,6
„ „ 18 „	82 „	8,1	85 „	8,1
„ „ 24 „	82 „	8,1	86 „	8,2

Das Mycel stammte von auf Molke gezüchteter *Oospora 16*.

Es zeigte sich, daß erst nach etwa 24 Stunden eine vollständige Erschöpfung des zu extrahierenden Materials eintrat.

Betrachtete man nun das bis zur Erschöpfung extrahierte Mycel unter dem Mikroskop, so zeigte sich nach Färben mit Sudanrot III, daß in den Zellen, die nicht durch das Zerreiben zerstört waren, die Fetttröpfchen noch in großer Zahl im getrockneten Plasma eingeschlossen waren. Zellmembran und Plasma ließen also im getrockneten Zustande den Äther auch nach stundenlanger Einwirkung nicht eindringen.

Ein noch feineres Verreiben würde diesen Übelstand wohl teilweise beseitigen, es erschien jedoch unmöglich, eine restlose Zerstörung aller Zellen zu erreichen.

Eine weitgehendere Zerkleinerung des Mycels durch Verreiben mit Quarzsand, mit der *Ruppel* (44) bei Ölsamen bessere Ergebnisse erzielte, brachte daher auch keine befriedigende Lösung, sondern zeigte, wenn

auch im geringeren Maße, die gleichen Fehler wie ein einfaches Zerreiben im Porzellanmörser. *Völtz* (50), der Fettbestimmungen in Hefe durchführte, erreichte eine noch weitgehendere Zerkleinerung des Materials durch stundenlanges Mahlen des getrockneten Materials in Kugelmühlen mit Porzellankugeln, was jedoch zu zeitraubend und für Massenanalysen daher nicht geeignet ist.

Deshalb wurde von einer mechanischen Zerkleinerung des Mycels zur Fettbestimmung abgesehen. Zur Aufschließung des Mycels kamen nun nur noch chemische oder biologische Methoden zur Zerstörung von Plasma und Membran in Frage, um so das Fett freizulegen, so daß es bei einem nachträglichen Ausschütteln mit Fettlösungsmitteln von diesen aufgenommen werden konnte.

Zunächst wurde versucht, durch Autolyse des frischen Mycels die Fetttröpfchen freizulegen und sie so einem Ausschütteln mit Äther zugänglich zu machen. Nach Angaben des DRP. 309266 Kl. 53h und nach *Lindner* (28), der bei Hefen auch eine nicht restlose Extraktion des Fettes durch Äther im *Soxhlet*-Apparat feststellte, hat sich diese Methode bei der Fettbestimmung in Hefe sehr gut bewährt. Für *Oospora* war diese Methode nicht brauchbar, da die Autolyse erst nach mehreren Tagen eintrat, und da viele Zellen überhaupt keine Selbstverdauung zeigten, so daß auch hier keine vollständige Entfettung zu erwarten war. Außerdem konnten hierbei nicht Trockensubstanz und Fett von ein und demselben Versuch festgestellt werden.

An chemischen Methoden kamen in Frage die Aufschließung des Mycels mittels Ammoniak oder mittels Alkalischmelze und die hydrolytische Spaltung von Plasma und Zellmembran durch Salzsäure.

Eine Lösung der Eiweißstoffe in kalter Ammoniaklösung war aber selbst bei Anwendung von 25 %igem Ammoniak nicht zu erreichen, da die Zellmembran sich nicht mit auflöste. Die zuerst von *Röse* (43) für die Fettbestimmung in Milch ausgearbeitete Methode wurde später von *Gottlieb* (12) verbessert. Beide erkannten die Wichtigkeit des Petrolätherzusatzes, der verhindert, daß Eiweißbestandteile und Wasser mit in die Äther-Fettschicht übergehen. Aus diesem Grunde wurde auch bei der später ausgearbeiteten Methode der Fettbestimmung im *Oospora*-Mycel Äther in Mischung mit Petroläther verwendet.

Bei der Freilegung des Fettes mittels einer Schmelze von Stangenätzkali nach *Haehn* und *Kinttof* (14) wird zunächst das getrocknete Mycel mit Ätzkali geschmolzen, wobei das Fett in Form seiner Fettsäuren in Freiheit gesetzt wird. Aus der mit Wasser verdünnten Schmelze werden die Fettsäuren, nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure, durch Petroläther ausgeschüttelt. Die vom Petroläther teilweise mit aufgenommene Schwefelsäure wird durch Waschen des Petroläthers entfernt und der Petroläther abdestilliert. Die so erhaltenen freien Fettsäuren werden in absolutem Alkohol gelöst und mit n/10 Lauge titriert. Die Umrechnung der verbrauchten Lauge geschieht dann auf Ölsäure bzw. Triolein.

Eigene Untersuchungen nach dieser Methode ergaben gute Werte, jedoch waren Massenuntersuchungen infolge der langwierigen Prozesse schlecht durchzuführen. Außerdem erschien es mir als Fehler, daß man die Umrechnung auf Ölsäure vornehmen mußte, ohne die Gewißheit zu haben, daß überhaupt im Pilzfett allein oder zum größten Teile Ölsäureglyceride vorgelegen haben.

Untersuchungen über die Zusammensetzung des Pilzfettes bei anderen Pilzen haben gezeigt, daß diese aus Triglyceriden verschiedener Fettsäuren bestehen. So besteht nach *Ward*, *Lewis*, *May* und *Herrik* (51) das Fett von *Penicillium* aus Glyceriden der Palmitin-, Stearin-, Olein- und α- und β-Linolensäure, was mit den früheren Feststellungen *Barbers* (2) übereinstimmt. *Daubney* und *Mac Lean* (8) fanden im Fett der *Hefe* Ölsäure, Linolensäure, Palmitinsäure und daneben Spuren von Laurinsäure. *Haehn* und *Kinttof* (14) fanden bei *Endomyces vernalis* eine verschiedene Zusammensetzung des Fettes je nach der Dauer und Art der Heranzüchtung.

Daher schien es angebracht, eine Methode anzuwenden, die es gestattete, die Umrechnung auf Ölsäure zu umgehen. Eine solche schien in der für die Milchfettbestimmung angewendeten Methode nach *Schmid-Bondzynski* gegeben zu sein.

Die Grundlagen der Fettbestimmung nach vorheriger Hydrolyse des zu untersuchenden Materials wurden von *Schmid* (45) entwickelt. Hierbei wird das Eiweiß der Milch durch Kochen mit 25 %iger Salzsäure zersetzt, wobei das Fett, wie die Untersuchungen von *Ratzlaff* (40) gezeigt haben, weitgehend geschont und nur zu einem geringen Teile in Fettsäuren und Glycerin gespalten wird.

Bondzynski (6) entwickelte diese Methode dann weiter, so daß sie auch für die Fettbestimmung in Käse Anwendung finden konnte.

Nach Lösung der Eiweißstoffe mit Salzsäure wird das Material dann nacheinander mit 10 ccm Alkohol, 25 ccm Äther und 25 ccm Petroläther in einem graduierten Schüttelzylinder von 100 ccm Volumen ausgeschüttelt und bis zu einer klaren Trennung der Äther-Petroläther-Fettschicht stehengelassen. Diese Äther-Fettschicht wird dann zu einem aliquoten Teile abpipettiert und der Äther abdestilliert. Im Destillierkolben bleibt das Fett zurück, das auf die Gesamtmenge umgerechnet wird.

Bei den Versuchen mit getrocknetem *Oospora*-Mycel zeigte sich, daß durch die 25 %ige Salzsäure das Mycel und das Filter bei 10 bis 15 Minuten Kochdauer vollständig aufgelost wird. Es bleibt eine dunkelbraune Flüssigkeit mit tröpfchenförmig suspendiertem Fett zurück. Beim Ausschütteln derselben mit Alkohol, Äther und Petroläther bleibt nach dem Absetzen der Flüssigkeiten im unteren Teile des Schüttelzylinders eine von Fett vollständig freie Schicht zurück. Die obere Schicht mußte somit alles Fett enthalten.

Die Fettbestimmungen erfolgten nun in folgender Weise: In einem 200 ccm-Weithals-*Erlenmeyer*-Kolben wird das Papierfilter mit dem angetrockneten Mycel unter Zugabe von 20 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,124) und einigen Glasperlen (Bimsstein ungeeignet!) auf einem Asbestdrahtnetz bei kleiner Flamme 10 bis 15 Minuten gekocht. Ein Uhrglas auf dem Kolben verhindert hierbei ein Verspritzen der Flüssigkeit und ein allzu starkes Eindampfen der Salzsäure. Nach dem Abkühlen auf etwa 30 bis 40° C wird die Flüssigkeit unter Nachspülen des *Erlenmeyer*-Kolbens mit 10 ccm Alkohol, 25 ccm Äther und 25 ccm Petroläther in den Schüttelzylinder überführt. Nach jeder Zugabe wird kräftig durchgeschüttelt. Zuletzt wird die Flüssigkeit im Schüttelzylinder auf die Marke 100 ccm mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach 8 bis 24 Stunden haben sich die Schichten vollständig getrennt, die leicht gelblich gefärbte Äther-Fettschicht ist vollkommen klar. Nun wird am Zylinder das Gesamtvolumen des Äther-Petroläther-Fettgemisches festgestellt und ein aliquoter Teil (etwa 40 ccm) abpipettiert. Als Destilliereinrichtung für den abpipettierten Äther hat sich besonders gut die Ein-

richtung nach *Schwarz* (48) bewährt, die unter Vermeidung von angeschliffenen Kolben trotzdem ein gutes Abdestillieren des Äthers gewährleistet.

Das im Destillierkolben zurückbleibende Fett wird bei 102 bis 103° C getrocknet. Die Trockendauer beträgt bis zur Gewichtskonstanz etwa 6 bis 10 Stunden. Ein allzu langes Trocknen ist unbedingt zu vermeiden, da sonst durch Autoxydation eine Gewichtszunahme des Fettes eintritt. Bei höheren Trockentemperaturen (105 bis 106° C) tritt leicht eine Zersetzung des Fettes ein, die man an dem stechenden Geruch nach Acrolein, einem Zersetzungsprodukt des Glycerins, erkennt.

Das bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Fett wird dann auf die Gesamtmenge des Äther-Fettgemisches, abgelesen am Schüttelzylinder, umgerechnet.

Im folgenden Versuch soll der Unterschied in der quantitativen Erfassung des Fettes durch die Ätherextraktion im *Soxhlet*-Apparat und durch die Salzsäuremethode nach *Schmid-Bondzynski* gezeigt werden.

Zu diesem Versuch wurde eine große Menge Pilzmaterial (*Oospora 16*) auf steriler Molke gezüchtet. Nach guter Fettbildung, festgestellt im mikroskopischen Präparat, wurde das Mycel abfiltriert, gewaschen und auf Glasplatten bei 103° C getrocknet. Das getrocknete Material wurde fein gemahlen (0,5 mm-Sieb).

Ein Teil des Mycels wurde nun in Extraktionshülsen abgewogen, wobei das genaue Gewicht erst nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz festgestellt wurde, und 24 Stunden mit Äther extrahiert. Ein anderer Teil des Mycels wurde im *Erlenmeyer*-Kolben (200 ccm) mit Salzsäure gekocht, wie oben beschrieben, und dann das Fett durch Ausschütteln mit Alkohol, Äther und Petroläther bestimmt. Das Ergebnis zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV. Vergleich der Fettbestimmung mit Hilfe der Ätherextraktion nach *Soxhlet* und mit Hilfe der Saurefettbestimmung nach *Schmid-Bondzynski* bei *Oospora 16*.

Fett bestimmt durch 24stündige Ätherextraktion			Fett bestimmt nach der Säurefettbestimmungsmethode		
Angewandte Mycelmenge mg	Fett mg	Fett in % der Trockensubstanz	Angewandte Mycelmenge mg	Fett mg	Fett in % der Trockensubstanz
346	29	8,4	331	75	22,6
327	27	8,2	338	75	22,6
630	51	8,1	629	142	22,6
614	50	8,1	603	137	22,7
1010	81	8,0	1019	230	22,5
1085	86	7,9	1075	243	22,6

Vergleicht man die Werte: Fett in Prozenten der Trockensubstanz, so fällt auf, daß mit wachsender Menge des zu extrahierenden Materials der prozentuale Fettgehalt abnimmt. Das kann nur darauf zurückzuführen sein, daß bei großer Einwage das Mycel viel langsamer vom Äther durchsickert wird, und daß die Extraktion deshalb noch nicht beendet ist trotz 24stündiger Dauer. Bei der Säurefettbestimmungsmethode zeigt die gleiche Spalte fast völlig gleiche, nur innerhalb der Versuchsfehlergrenzen diffe-

rierende Werte, die außerdem viel höher sind als die nach der Extraktionsmethode erhaltenen, was auf der weit vollständigeren Aufschließung des Materials mittels Salzsäure beruht. Mikroskopisch ließ sich denn auch noch eine Menge Fett in dem mit Äther extrahierten Material feststellen.

Außerdem ist noch zu bedenken, daß im Fett, gewonnen nach der *Soxhlet*-Methode, organische Verbindungen gelöst sind, die nicht zu den eigentlichen Fetten gehören, und die bei einer Hydrolyse mit Säuren in Spaltprodukte zerfallen, die nur zum Teil in Äther löslich sind, wie Phosphatide (Lecithin) und Phytosterine (Ergosterin); von den Spaltungsprodukten des Lecithins sind z. B. nur Cholin und die Fettsäuren im Äther löslich, während Glycerin und Phosphorsäure in die wässerige Schicht übergehen.

Um nun zu zeigen, daß tatsächlich im nach *Soxhlet* extrahierten Fett von *Oospora* noch Stoffe enthalten sind, die bei der Hydrolyse mit Salzsäure in die wässerige Schicht übergehen, wurde ein auf diese Weise gewonnenes Pilzfett mit Salzsäure hydrolysiert und mit Äther-Petroläther ausgeschüttelt. Es zeigte sich in allen Fällen ein Verlust von etwa 12,9 % der eingewogenen Fettmenge (nach *Soxhlet*). (Siehe Tabelle V.) Wie in ähnlichen Versuchen festgestellt wurde, hängt der Verlust von der Art des Pilzes und seiner Heranzüchtung ab. Der Verlust betrug bei den Fetten von *Oospora 14, 16, 32* stets etwa 10 bis 15 %.

Aus den Tabellen IV und V geht hervor, daß die Genauigkeit der Methode *Schmid-Bondzynski*, unabhängig von der angewendeten Menge, sehr groß ist. Versuche, die Genauigkeit noch weiter zu steigern, erwiesen sich als zwecklos. So war bei Versuchen, an Stelle des Schüttelzylinders, der eine Ablesegenauigkeit von 0,5 ccm hatte, das in 0,1 ccm unterteilte *Farnsteiner*-Rohr zu verwenden [*Farnsteiner* (11)], die Absetzgeschwindigkeit in diesem mit zwei engen Stellen zwischen den kugeligen Erweiterungen versehenen Rohr erheblich schlechter als im glattwandigen Schüttelzylinder, wodurch die Ablesegenauigkeit wieder aufgehoben wurde. Auch erwies sich ein zweimaliges Ausschütteln mit Äther-Petroläther als überflüssig, da die zum zweiten Male erhaltene Fettmenge weniger als 1 % der durch die erste Ausschüttelung erhaltenen Fettmenge ausmachte, wobei noch nicht einmal sicher war, ob diese Fettmenge nicht von dem beim Pipettieren verdunsteten Äther-Fett-Gemisch herrührte, welches an der Zylinderwand haften blieb.

Tabelle V. Verlust an ätherlöslichen Stoffen durch die Hydrolyse des Pilzfettes.

Fett nach *Soxhlet* mg	Nach Hydrolyse zurückerhaltenes Fett mg	Differenz mg	Verlust in % des eingewogenen Fettes %	Fett nach *Soxhlet* mg	Nach Hydrolyse zurückerhaltenes Fett mg	Differenz mg	Verlust in % des eingewogenen Fettes %
186	162	24	12,9	461	401	60	13,0
279	243	36	12,9	938	816	122	13,0
370	323	47	12,7				

Über die Kochdauer des getrockneten Mycels mit Salzsäure ist noch zu sagen, daß ein Variieren zwischen 10 und 25 Minuten langem Kochen die gleichen Werte lieferte, sofern nur nach 10 Minuten langem Kochen schon eine vollständige Lösung des Mycels eingetreten war. Irgendwelche weiteren Zersetzungen des Fettes waren innerhalb der angegebenen Zeiten nicht zu beobachten.

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Messungen erfolgten mittels Potentiometer und Kalomel-Chinhydronelektrodenkette. Bei p_H-Werten alkalischer als 7,9 wurde im allgemeinen mit der Kalomel-Wasserstoffelektrodenkette gearbeitet.

Messungen mit der Wasserstoffelektrode in Nährmedien, die durch langes Wachstum von *Oospora* stark alkalisch geworden waren, zeigten jedoch eine äußerst langsame Einstellung des Endpotentials, so daß bis zur Messungskonstanz für die einzelne Messung etwa 20 bis 30 Minuten benötigt wurden. Als Ursachen dieser auf Vergiftung der Elektrode hinweisenden langsamen Potentialeinstellung kamen Schwefelwasserstoff und Ammoniak in Frage. Schwefelwasserstoff konnte niemals nachgewiesen werden; Ammoniakbildung ließ sich in allen älteren *Oospora*-Kulturen nachweisen. Die Bestimmung des Ammoniaks wurde hierbei im Vakuum (40 mm Hg) unter Zusatz von Magnesiumoxyd ausgeführt. Diese von *Rippel* (41) angegebene Methode verhütete bei der Destillation die Abspaltung von Ammoniak aus den durch Abbau von Eiweiß entstandenen Aminosäuren.

Um nun auch in diesen Fällen noch eine p_H-Bestimmung vornehmen zu können, wurde die Wasserstoffionenkonzentration mit dem Folienkolorimeter nach *Wulff* (19) bestimmt. Hierbei mußte ein nicht kontrollierbarer Eiweißfehler auftreten, der jedoch bei diesen Messungen unbedeutend war.

III. Fettbildung bei Oospora.

Die Dauer der Fettbildung bei Oospora.

Zur Feststellung der maximal gebildeten Fettmenge und der Zeit, in der dieses Fettmaximum erreicht wird, wurden je 50 ccm Molke p_H 5,5 in Kulturflaschen mit einem inneren Durchmesser von 42 mm abgefüllt und dreimal im Dampftopf sterilisiert. Die Beimpfung erfolgte mit einer Abschwemmung einer drei Tage alten Schrägagarkultur von *Oospora* auf Würzeagar. Die Keimmenge der Abschwemmung wurde durch Auszählen in einer *Thoma*-Kammer festgestellt und die Einsaat so geregelt, daß mit etwa 5000 bis 10000 Keimen (Oidien) geimpft wurde.

Die Einsaatmenge mußte stets gleich bleiben, da anderenfalls, wie in Vorversuchen ermittelt wurde, eine verschieden starke Vermehrung besonders im Anfang der Kultur festzustellen war. Bei gleicher Einsaat in jede Kulturflasche ergab die Trockensubstanz und Fettbestimmung von Parallelkulturen stets Werte, die gut miteinander vergleichbar waren. Die gleiche Tatsache der Abhängigkeit des Trockengewichtes von der Einsaatmenge wurde auch schon von *Schwarz* und *Kautzmann* (47) bei Versuchen mit obergäriger Hefe festgestellt. Die ungleichen Werte für die Myceltrockensubstanz bei Versuchen mit Schimmelpilzen, die von *Ward*, *Lockwood*, *May* und *Herrik* (51) gefunden wurden, und die Parallelbestimmungen nicht erlaubten, dürften auf ungleiche Einsaatmenge zurückzuführen sein.

Die Beimpfung erfolgte mit den *Oospora-Stämmen 13, 14, 16, 17* und *32*. Diese Stämme wurden ausgewählt als typische Vertreter der Gruppen „*L*“ und „*M*“.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen VI bis VIII zusammengefaßt. Die Bildung von Fett zeigte ein Ansteigen bis zu etwa 75 bis 100 Tagen, danach fand ganz allmählich und sehr langsam ein geringes Absinken der Werte statt. Untersuchte man das Mycel, so ergab sich, daß es zu einer teilweisen Auflösung der Zellwände der jetzt eiweißleeren Zellen gekommen war. Hierdurch waren viele Fetttröpfchen frei geworden und gingen beim Filtrieren mit durch das

Tabelle VI.

Alter der Kultur in Tagen	Dauer der Fettbildung bei *Oospora 38*											
	Trockensubstanz mg				Fettmenge mg				Trockensubstanz im Mittel mg	Fett im Mittel mg	Fett der Trockensubstanz im Mittel %
1	12	14	11	12	—	—		—	12	—	—
2	33	29	28	30	—	—	—	—	30	—	—
4	94	107	117	99	13	15	16	14	104	15	14,4
6	144	146	132	137	21	23	20	23	139	22	15,8
8	169	171	148	161	26	29	25	27	162	27	16,7
21	251	277	268	274	55	58	56	49	267	55	17,8
25	297	293	296	268	65	63	65	60	289	64	19,0
35	355	331	346	351	72	71	74	76	346	73	21,1
55	473	455	486	449	119	111	123	116	466	117	25,0
75	557	543	568	553	141	129	150	144	555	141	25,4
98	639	617	628	610	153	158	151	158	624	155	24,8
120	648	621	629	651	169	146	154	160	637	157	24,6
141	659	623	628	619	145	131	149	125	632	138	21,8
170	634	610	638	617	128	133	138	140	625	135	21,6

Tabelle VII.

Alter der Kultur in Tagen	Dauer der Fettbildung bei *Oospora 14*											
	Trockensubstanz mg				Fettmenge mg				Trockensubstanz im Mittel mg	Fett im Mittel mg	Fett der Trockensubstanz im Mittel %
1	13	17	15	15	—	—	—	—	15	—	—
2	69	55	53	61	—	—	—	—	59	—	—
4	144	128	123	134	18	23	16	19	132	19	14,4
6	182	212	202	197	24	44	32	30	198	33	16,7
8	209	222	204	200	44	34	42	42	209	41	19,6
21	359	350	449	360	109	99	161	102	379	118	31,2
25	450	445	438	390	150	155	149	133	431	147	34,1
35	587	459	493	446	256	163	163	153	496	184	37,1
55	562	548	582	509	249	254	258	236	550	249	45,3
75	569	557	575	551	253	264	258	253	563	257	45,6
100	583	581	547	602	250	234	236	244	578	241	41,7
120	594	601	581	553	234	246	242	234	582	239	41,2
140	591	608	570	561	228	228	259	232	583	237	40,7
170	554	608	617	562	217	218	224	241	585	223	38,3

Tabelle VIII.

Alter der Kultur in Tagen	Dauer der Fettbildung								
	bei *Oospora 13*			bei *Oospora 17*			bei *Oospora 16*		
	Trockensubstanz im Mittel	Fett im Mittel	Fett der Trockensubstanz im Mittel	Trockensubstanz im Mittel	Fett im Mittel	Fett der Trockensubstanz im Mittel	Trockensubstanz im Mittel	Fett im Mittel	Fett der Trockensubstanz im Mittel
	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%
1	—	—	—	—	—	—	14	—	—
2	22	—	—	24	—	—	41	—	—
4	43	—	—	59	2	3,4	71	17	24,0
6	53	2	3,8	93	4	4,3	97	24	24,8
8	74	4	5,4	132	9	6,8	148	43	29,1
20	139	8	5,7	272	23	8,5	331	112	33,9
25	171	10	5,9	311	27	9,0	397	140	35,1
35	184	12	6,5	361	40	11,0	462	172	37,3
55	201	15	7,5	401	52	13,0	541	213	39,4
75	212	16	7,6	433	63	14,5	573	250	43,6
100	223	19	8,5	442	65	14,7	592	243	41,1
120	217	18	8,3	430	61	14,2	580	239	41,2
140	218	18	8,3	423	59	14,0	567	231	40,8
170	212	17	8,0	417	58	13,9	562	229	40,8

Filter, sie waren somit für die nachfolgende Fettbestimmung verloren. Es konnte also aus diesem Zurückgehen der Fettmenge kein Schluß auf einen Abbau des Fettes durch die Zelle gezogen werden.

Die maximale Fettmenge war dann gebildet, wenn es beim Umschütteln der Kultur nicht mehr zu einer Neubildung der untergesunkenen Haut kam. In diesem Falle war also das Nährmedium völlig ausgenutzt, oder es hatten sich soviel hemmende Stoffwechselprodukte gebildet, daß ein weiteres Wachstum nicht mehr erfolgte.



Abb. 8. Federstrich in Molke Degenerationsfett bei *Oospora 32*.

Die beiden Gruppen „*M*“ und „*L*“ zeigten deutlich ein verschiedenes Verhalten hinsichtlich der Fettbildung, wie es nach den Voruntersuchungen beim Bestimmen der Stämme zu erwarten war. Die Stämme der Gruppe „*L*“ bildeten maximal 8,5 bis 14,7 % Fett in der Trockenmasse, die Stämme der Gruppe „*M*“ 25,4 bis 45,6 %.

Es schien in diesem Zusammenhang interessant, zu untersuchen, ob es sich um Reservefett oder um Degenerationsfett handelte. Reservefett müßte bei Zufuhr neuer Nährstoffe und bei Entfernung hemmender Stoffe wieder zum Aufbau neuer Zellen verwendet werden können.

Wurden aber derartig stark verfettete Zellen in Federstrichkulturen mit frischer Molke übertragen, so zeigten diese Zellen kein Auskeimen und kein Verschwinden der Fetttröpfchen (Abb. 8, S. 83).

Nur ganz wenig verfettete Zellen zeigten ein Auskeimen und anscheinend eine Auflösung des Fettes, wobei jedoch nicht sicher war, ob es sich hierbei nicht nur um eine Zerteilung der größeren Fetttropfen beim Auskeimen handelte, bei der also die großen Fetttropfen in ganz kleine aufgelöst wurden, die unter der Sichtbarkeitsgrenze des Mikroskops lagen. Auch bei Tröpfchenkulturen in Wasser kam es nicht zu einer Auflösung des Fettes.

Bei den quantitativen Versuchen konnte ebenfalls keine Abnahme des Fettes festgestellt werden. Wurde nämlich in den Kulturflaschen die Molke mit einer Pipette unter der Mycelhaut abgezogen und durch neue Molke oder Leitungswasser ersetzt, so ergab sich auch hierbei kein Fettabbau.

Bei Zusatz frischer Molke erfolgte sofort weitere Fett- und Mycelbildung, bei Zufuhr von Wasser zeigte sich innerhalb von 10 Tagen keine Änderung der Trockensubstanz und des Fettgehalts.

Nach diesen Untersuchungen handelte es sich also um Degenerationsfett, welches als Stoffwechsel-Endprodukt in toten oder zumindest nicht mehr keimungsfähigen Zellen zurückgeblieben ist.

Einfluß des p_H-Wertes auf Wachstum und Fettbildung von Oospora in Molke.

Die bei den bisherigen Versuchen verwendete Molke hatte einen p_H-Wert von etwa 5,5. Dieser Wert erschien nach Vorversuchen als der günstigste für das Wachstum von *Oospora* in Molke.

Die Vorversuche wurden ausgeführt in steriler Molke, abgefüllt in Reagensröhrchen (10 ccm) und durch Zugabe von steriler 5%iger Milchsäure und 3%iger Natronlauge eingestellt auf die in Tabelle IX angegebenen p_H-Werte. Das Wachstumsoptimum wurde nach 48 Stunden an der Dicke der gebildeten Haut festgestellt. Es wurden sämtliche Stämme geprüft, der Übersicht wegen sind aber nur einige in Tabelle IX aufgeführt.

Wie Tabelle IX (S. 85) zeigt, lag bei den Stämmen der Gruppe „*M*" das Wachstumsmaximum zwischen 5,4 und 5,9 p_H; bei den Stämmen der Gruppe „*L*" war es etwas nach dem sauren Bereich verschoben und lag zwischen 5,1 und 5,4 p_H. Nach 48stündigem Wachstum wurde außerdem noch die p_H-Änderung des Nährmediums nachgeprüft. Es zeigte sich, daß innerhalb dieser Zeit nur eine geringe p_H-Änderung eingetreten war, die etwa $\pm$ 0,1 betrug; und zwar war die alkalische Molke etwas saurer und die saure Molke etwas alkalischer geworden.

Der für das Wachstum beider Gruppen günstigste p_H-Bereich schien nach diesen Untersuchungen zwischen p_H 5,3 und 5,6 zu liegen.

Tabelle IX. Wachstum der *Oospora* Stämme bei verschiedenen p_H-Werten in Molke.

Stamm Nr	Gruppe	p_H Werte 3,11	3,47	4,24	4,61	5,16	5,43	5,89	6,44	7,03	7,45	8,18	9,10	9,85
13	„L"	–	+	++	++	++++	++++	+++	++	+	+	+	–	–
14	„M"	–	–	+	++	++	++++	+++	+	+	+	+	(+)	–
15	„M"	–	–	–	+		++	+++	+	+	+	(+)	–	–
16	„M"	–	–	+	+	+	+++	++++	++	+	(+)	–	–	–
17	„L"	–	+	+	++	+++	++	++	+	+	+	+	(+)	–
19	„L"	–	+	++	+	++++	+++	+++	+	+	+	+	–	–
23	„L"	–	++	+++	+++	++++	+++	+++	+	+	+	+	–	–
27	„M"	–	–	++	+++	+++	++++	+++	++	+	+	+	–	–
30	„L"	–	+	+++	+++	++++	+++	++	++	+	+	+	–	–
32	„M"	–	–	++	++	++	++++	+++	++	++	+	(+)	–	–

Tabelle X. Wachstum und Fettbildung von *Oospora*-Stämmen in Molke bei verschiedenen p_H-Werten.

p_H-Wert	*Oospora 16* Mittelwert der Trockensubstanz mg	Mittelwert der Fettmenge mg	Fett der Trockensubstanz %	*Oospora 14* Mittelwert der Trockensubstanz mg	Mittelwert der Fettmenge mg	Fett der Trockensubstanz %	*Oospora 17* Mittelwert der Trockensubstanz mg	Mittelwert der Fettmenge mg	Fett der Trockensubstanz %	*Oospora 23* Mittelwert der Trockensubstanz mg	Mittelwert der Fettmenge mg	Fett der Trockensubstanz %
4,4	284	46	16,2	272	58	21,3	291	24	8,2	117	9	7,7
5,2	391	84	21,5	417	132	31,7	389	45	11,5	182	11	10,4
5,9	492	147	29,9	436	151	34,7	364	38	10,4	174	17	9,8
6,6	417	74	17,8	391	107	27,4	307	27	8,8	153	11	7,2

In weiteren Untersuchungen sollte nun festgestellt werden, ob der *optimale Wachstumsbereich* mit dem *optimalen Fettbildungsbereich* zusammenfiel.

Die Molke wurde in der oben angegebenen Weise auf bestimmte p_H-Werte eingestellt und in Kulturflaschen zu je 50 ccm abgefüllt. Die Beimpfung und Weiterbehandlung erfolgte wie im vorigen Kapitel angegeben.

Nach den in Tabelle X (S. 85) angeführten Versuchsergebnissen (Versuchsdauer 30 Tage) wurde bei optimalen Wachstumsbedingungen auch ein Maximum an Fett gebildet. Die Werte sind Mittelwerte aus je fünf Untersuchungen. Die Stämme *17* und *23* (Gruppe „*L*") zeigten ein Fettbildungsmaximum bei p_H 5,2, die Stämme *16* und *14* (Gruppe „*M*") bei p_H 5,9.

Über die Abhängigkeit der Fettbildung bei Oospora von der Größe der Oberfläche.

Besonders die von *Lindner* (26, 27, 29) an *Endomyces vernalis* angestellten Versuche deuteten samtlich darauf hin, daß zu einer guten Fettbildung eine moglichst große Oberflache notwendig ist, durch die eine gute Luftzufuhr bedingt wird. was auch in der Patentschrift DRP. 306365, 53 h, hervorgehoben ist. Nach der Patentschrift des DRP. 307789, 53 h, zeigt *Hefe*, die durch ein Diaphragma oder ein Filtertuch auf der Oberfläche der moglichst flachen Nährflüssigkeit gehalten wurde, stärkste Verfettung. Auch *Ballière*, *Tindall* und *Cox* (1) betonen die Wichtigkeit der Luftzufuhr und der moglichst großen Oberflache des Nährmediums für den Anstieg des Fettgehaltes bei *Hefen*, *Aspergillus* und *Rhizopus*, und *Ward*, *Lockwood* u. a. (51) verwendeten zur Züchtung fettreicher Schimmelpilze flache Schalen mit über 1 qm Oberflache, um durch die hierdurch bedingte gute Luftzufuhr ein möglichst fettreiches Mycel zu erhalten.

Hiernach könnte man nun annehmen, daß eine möglichst große Oberfläche ein Maximum an Fett liefern müßte. Demgegenüber stand aber die Beobachtung, daß bei großer Oberfläche des Nährmediums die Häute, die *Oospora* ausbildete, sehr dünn bleiben und leicht untersinken. Auch verloren die Häute der Stämme der Gruppe „*M*" ihre charakteristische hirnartige Faltung, die nur in Kulturen mit kleiner Oberfläche gut zu beobachten war.

Es könnte also der Fall eintreten, daß ein stark gefaltetes Mycel auf einer kleinen Oberfläche des Nährmediums infolge der Vergrößerung der Hautoberfläche durch Faltung ein höheres Fettbildungsmaximum hat als ein nicht gefaltetes Mycel auf einer großen Oberfläche.

Um die Abhängigkeit der Fettbildung von der Oberfläche festzustellen, wurden je 50 ccm Molke in *Erlenmeyer*-Kolben von verschiedener Große abgefüllt. Hierdurch erhielt man bei einem

500-ccm-*Erlenmeyer* eine Oberfläche von 71 qcm
300- „ „ „ „ „ 57 „
200- „ „ „ „ „ 37 „
100- „ „ „ „ „ 19 „

Die Einsaat erfolgte in der gleichen Weise wie bisher angegeben.

Das Fettbildungsmaximum wurde festgestellt durch Untersuchungen in Abständen von 8 bis 14 Tagen.

Nach den in Tabelle XI angegebenen Versuchsergebnissen bilden nun in der Tat, wie vermutet, die stark fettbildenden Rassen der Gruppe „*M*“, *Oospora 14, 15* und *32*, ein Maximum an Fett nicht bei der größten Oberfläche. Bei *Oospora 15* lag das Fettbildungsmaximum bei der kleinsten untersuchten Oberfläche von 19 qcm, bei *Oospora 14* und *32* bei einer Oberfläche von 37 qcm. Für eine Fettgewinnung durch Züchtung von *Oospora* in einem Fabrikverfahren wäre danach bei den fettbildenden Stämmen nicht mit großer Oberfläche zu arbeiten.

Bei den wenig Fett bildenden Stämmen war die größte Fettmenge bei größter Oberfläche gebildet. Eine noch weitere Vergrößerung der Oberfläche (über 71 qcm) brachte leider ein starkes Austrocknen durch Verdunstung mit sich, wodurch den Untersuchungen eine Grenze gesetzt wurde.

Die Bildung der *maximalen* Fettmenge trat bei den untersuchten Kulturen auf großer Oberflache nicht schneller ein als bei den Kulturen, die auf kleiner Oberfläche wuchsen, jedoch war die Zunahme von Trockenmasse und Fett anfangs bei allen Kulturen auf großer Oberfläche stärker.

Aus allen Untersuchungen ging hervor, daß die Abhängigkeit des Fettmaximums von der Oberfläche weit geringer war, als man nach den Untersuchungen anderer Autoren annehmen konnte.

Fettbildung in Lüftungs- und Schüttelkulturen.

Die Annahme, daß die Fettbildung durch fein verteilte eingeblasene Luft oder durch Schütteln gefördert werden könne,

Tabelle XI. Abhängigkeit des Fettbildungsmaximums von der Oberfläche des Nährmediums.

Oberfläche der Molke	*Oospora 14* Versuchsdauer 80 Tage			*Oospora 15* Versuchsdauer 75 Tage			*Oospora 32* Versuchsdauer 102 Tage			*Oospora 13* Versuchsdauer 82 Tage			*Oospora 18* Versuchsdauer 94 Tage			*Oospora 23* Versuchsdauer 86 Tage		
	Trockensubstanz	Fett	Fett der Trockensubstanz	Trockensubstanz	Fett	Fett der Trockensubstanz	Trockensubstanz	Fett	Fett der Trockensubstanz	Trockensubstanz	Fett	Fett der Trockensubstanz	Trockensubstanz	Fett	Fett der Trockensubstanz	Trockensubstanz	Fett	Fett der Trockensubstanz
qcm	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%
71	497	179	36,0	643	154	24,0	673	156	23,2	266	21	7,9	322	32	9,9	279	31	11,1
57	505	205	40,5	616	158	25,6	649	174	26,8	236	19	8,1	294	30	10,2	247	28	11,3
37	557	254	45,7	607	167	27,5	629	199	31,6	179	16	8,9	232	28	12,1	195	24	12,3
19	580	218	36,8	605	181	29,9	624	144	23,1	162	14	8,6	218	26	11,9	184	23	12,5

war naheliegend, und die Untersuchung erschien, da eine Art Lüftungsverfahren wie bei der Preßhefefabrikation technisch leicht durchgeführt werden könnte, wünschenswert.

Ein Einblasen von fein verteilter Luft durch poröse unglasierte Tonkerzen erwies sich als nicht möglich, da hierdurch ein starkes Schäumen der Molke eintrat, welches sich noch im Laufe der weiteren Kultur durch die entstehenden Eiweißabbaustufen (Peptone) verstärkte. Beim Einblasen von nur einzelnen großen Luftblasen durch ein Glasrohr von 6 mm Durchmesser wurde das Schäumen der Molke zwar vermindert, jedoch zeigte das so belüftete Mycel einen geringeren Gehalt an Trockensubstanz und Fett als das in ruhender Molke gezüchtete. Wurden nun Stoffe, die die Oberflächenspannung erhöhen, zur Verhinderung des Schäumens zugesetzt wie Octylalkohol oder das in der Lufthefefabrikation verwendete Wollöl, so trat selbst bei geringster Zugabe nach kurzer Zeit eine deutliche Wachstumshemmung ein.

Deshalb wurde von einem Einblasen von Luft Abstand genommen.

Durch Schütteln der Kulturen ließ sich nun ebenfalls eine gute Durchlüftung und Durchmischung des Nährmediums erreichen, ohne daß es dabei zu der lästigen Schaumbildung kam. Die Kulturen wurden in diesem Falle mit 50 ccm Molke in 200 ccm-*Erlenmeyer*-Kolben auf einer Schüttelmaschine geschüttelt, wobei das Tempo des Schüttelns variiert wurde. Das Tempo der Schüttelmaschine betrug: a) 72 Bewegungen/Minute, ohne Unterbrechung; b) 72 Bewegungen/Minute, nach einstündiger Dauer 1 Stunde Ruhe; c) 72 Bewegungen/Minute, nach einstündiger Dauer 2 Stunden Ruhe.

Es zeigte sich, daß die Kulturen mit der größten Ruhezeit nach dem Schütteln am meisten Fett und Mycel gebildet hatten; die Mycelmenge lag aber ebenso wie die Menge des Fettes bei den geschüttelten Kulturen beträchtlich unter der Ausbeute bei Züchtung in Kulturen mit ruhender Oberfläche. Der Gehalt an Fett und Mycel war bei ruhender Kultur dreibis viermal größer als bei den Schüttelkulturen.

Das Schütteln bewirkte also eine Wachstumshemmung und war, ebenso wie die Durchlüftung, nicht geeignet, die Fettbildung zu fördern.

Untersuchungen über den Einfluß von Milchsäurebakterien auf das Fettbildungsvermögen bei Oospora.

Schon das weitverbreitete Vorkommen von *Oospora* auf milchsauren Substraten wie Dickmilch, Quarg, Käse, Sauerfutter, Sauerkohl, Salzgurken und Preßhefe ließ auf eine günstige Wirkung der Milchsäure und der durch sie hervorgerufenen sauren Reaktion des Nährbodens schließen.

Aus den Untersuchungen von *Grimmer*, *Bodschwinna* und *Lignau* (13) über die Symbiose von Milchsäurebakterien mit *Oospora lactis* ging hervor, daß der Eiweißabbau in Casein enthaltenden Nährlösungen stärker war, wenn beide Organismen zusammen wuchsen. Nahere Untersuchungen über die Ursache dieses verstärkten Eiweißabbaues wurden nicht angestellt. Zu dem gleichen Ergebnis, Förderung des Eiweißabbaues durch die Milchsäurebakterien, kam auch *Ritter* (42). Eine symbiontische, d. h. gegenseitig fördernde, Wirkung der beiden Organismen stellte auch *Lembke* (25) fest bei Untersuchungen über den Caseinabbau in Sauermilchkäsen. Weitere

Angaben über eine Vermehrung der Keimzahl von *Oospora* in Symbiose mit *Streptococcus lactis* enthalten die Untersuchungsergebnisse von *Linneboe* und *Hastings* (32). *Haehn* und *Kinttof* (14) zeigten, daß *Endomyces vernalis* aus Milchsäure Fett zu bilden vermag.

Es schien deshalb angebracht, einmal die Wirkung der Milchsäurebakterien auf das Fettbildungsvermögen von *Oospora* näher zu untersuchen, besonders auch noch deshalb, weil in den Abwasseranlagen, in denen verfettete *Oospora*-Zellen gefunden wurden, sich stets Milchsäurebakterien in überwiegendem Maße vorfanden, die teilweise eine schwach saure Reaktion des Abwassers bedingten (p_H 5 bis 6).

Die Versuche wurden in folgender Weise angesetzt: 200-ccm-*Erlenmeyer*-Kolben wurden mit je 50 ccm Molke beschickt. In Reihe 1 wurden alle Kolben mit *Oospora*-Stämmen in der gleichen Weise, wie früher angegeben, in Reihe 2 mit Milchsäurebakterien, in Reihe 3 mit *Oospora* + Milchsäurebakterien beimpft.

Von den *Oospora*-Stämmen fanden die typischen Vertreter der Gruppe „*L*" *13, 17, 23* und der Gruppe „*M*" *14, 16, 32* Verwendung.

Die Milchsaurebakterien wurden nach *Orla-Jensen* (37) bestimmt. Es wurden drei typische Stämme, die nur Milchsäure bildeten, ausgewählt, nämlich *Streptobacterium casei Orla-Jensen*, *Streptococcus lactis Orla-Jensen* und *Str. cremoris Orla-Jensen*.

Es wurden nun in Abständen von 8 bis 14 Tagen je drei Kolben der Reihe 1, drei Kolben der Reihe 2 und drei Kolben der Reihe 3 untersucht und der Mittelwert der Fettbildung und der Trockensubstanz bestimmt. Die Trockensubstanz der Milchsäurebakterien in Reihe 2 wurde auf einem kleinen bakteriendichten *Seitz*-Filter, dessen Filterplatte bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und genau ausgewogen wurde, bestimmt. In Reihe 3 ging ein Teil der Milchsaurebakterien bei der zur Trockensubstanzbestimmung nötigen Filtration mit durch das verwendete Papierfilter, jedoch erwies sich ihre Trockenmasse, bestimmt auf einem *Seitz*-Filter, so gering, daß dieser Verlust (etwa 2% der Gesamttrockensubstanz) unberücksichtigt bleiben konnte.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle XII (S. 90) wiedergegeben. Hierbei zeigte sich, daß die wenig Fett bildenden Stämme der Gruppe „*L*" eine Förderung des Fettbildungsmaximums in der Mischkultur mit *Streptobacterium casei Jensen* erfuhren. Die sonst stark Fett bildenden Stämme der Gruppe „*M*" zeigten eine geringere maximale Fettbildung in Mischkultur mit *Streptobacterium casei*.

Erfolgte statt der Impfung mit *Streptobacterium casei* eine Impfung mit *Streptococcus lactis* oder *Streptococcus cremoris*, so trat die gleiche Erscheinung ein, so daß auf eine tabellarische Darstellung dieser Versuche verzichtet werden konnte. Die Untersuchungsergebnisse zeigten keine wesentlichen Abweichungen.

Von besonderem Interesse war noch, daß die Milchsäurebakterien in Mischkultur mit *Oospora* (Reihe 3) noch nach drei bis vier Monaten voll lebensfähig waren, während sie in der Reinkultur in Molke (Reihe 2) schon nach etwa 6 bis 8 Wochen durch Übersäuerung vollständig ab-

Tabelle XII. Fettbildung durch *Oospora* in Mischkultur mit *Streptobacterium casei Orla-Jensen.*

Beimpft mit	*Oospora 23*, Kulturdauer 92 Tage					*Oospora 13*, Kulturdauer 96 Tage					*Oospora 17*, Kulturdauer 85 Tage				
	p_H Anfang	p_H Ende	Trockensubstanz mg	Fett mg	Fett der Trockensubstanz %	p_H Anfang	p_H Ende	Trockensubstanz mg	Fett mg	Fett der Trockensubstanz %	p_H Anfang	p_H Ende	Trockensubstanz mg	Fett mg	Fett der Trockensubstanz %
Oospora	5,6	8,85	213	17	8,0	5,6	8,95	270	20	7,4	5,6	9,05	436	52	11,9
Streptobacterium . . .	5,6	4,10	19	—	—	5,6	4,08	21	—	—	5,6	4,12	23	—	—
Oospora + Streptobact	5,6	4,22	721	101	14,0	5,6	4,18	694	89	12,8	5,6	4,12	1156	151	13,1

Beimpft mit	*Oospora 32*, Kulturdauer 90 Tage					*Oospora 16*, Kulturdauer 104 Tage					*Oospora 14*, Kulturdauer 72 Tage				
	p_H Anfang	p_H Ende	Trockensubstanz mg	Fett mg	Fett der Trockensubstanz %	p_H Anfang	p_H Ende	Trockensubstanz mg	Fett mg	Fett der Trockensubstanz %	p_H Anfang	p_H Ende	Trockensubstanz mg	Fett mg	Fett der Trockensubstanz %
Oospora	5,6	6,87	614	167	27,2	5,6	8,70	685	279	40,7	5,6	8,00	620	301	48,5
Streptobacterium . . .	5,6	4,08	19	—	—	5,6	4,06	15	—	—	5,6	4,06	19	—	—
Oospora + Streptobact.	5,6	4.16	424	91	21,5	5.6	4,13	411	153	37,2	5,6	4,07	464	157	33,8

gestorben waren. Die aus der Mischkultur wieder isolierten Stämme von Milchsäurebakterien zeigten keine Degenerationserscheinungen. Das Zuckersäuerungsvermögen war ungeschwächt erhalten geblieben. Da man die Milchsäurebakterien aus der Mischkultur leicht wieder isolieren konnte, war hiermit eine Möglichkeit gegeben, die sonst in Reinkultur leicht absterbenden Milchsäurebakterien längere Zeit ohne vielfaches Überimpfen lebend zu erhalten.

Das verschiedene Verhalten der beiden Gruppen „*M*" und „*L*" in Mischkultur mit Milchsäurebakterien mußte physiologisch bedingt sein. Um hierüber Klarheit zu erhalten, wurde bei allen Stämmen die Zuckerassimilation geprüft.

Bei den Untersuchungen der Zuckerassimilation in flüssigen Nährböden aus anorganischen Salzen mit Harnstoff, Asparagin oder NH_4Cl als Stickstoffquelle und mit dem zu untersuchenden Zucker, zeigten nur die Stämme der Gruppe „*L*" Wachstum, nicht aber die Stämme der Gruppe „*M*".

Auf festen Nährböden ließ sich jedoch ein — wenn

auch geringes, so doch deutliches — Wachstum der Stämme der Gruppe „*M*“ bei geeigneter C-Quelle nachweisen. Die Wachstumsunterschiede konnten besonders gut gegenüber einer zuckerfreien Kontrollplatte festgestellt werden, auf der auch ein geringes Wachstum eintrat, bedingt durch nicht mit Wässern zu entfernende Kohlenhydrate aus dem Agar oder durch Assimilation von Alkoholdämpfen, die durch gleichzeitig im Brutschrank vorhandene Hefekulturen entstanden [*Lindner* (31)].

Es fanden zwei feste Nährböden Verwendung:

Nährboden I. 30,00 g Agar, dreimal in dest. Wasser ausgewaschen; 1,00 g K_2HPO_4; 0,50 g $MgSO_4$; 0,02 g NaCl; Spur $FeSO_4$; Spur $Ca_3(PO_4)_2$; 1,63 g NH_4Cl. Aufgefüllt auf 1000 ccm Wasser und im Autoklaven sterilisiert. Das p_H dieses Nährbodens war 7,3 bis 7,4, es lag besonders günstig für die Untersuchung der Milchzuckerassimilation (Optimum p_H 7,0).

Nahrboden II. An Stelle von K_2HPO_4 die gleiche Menge KH_2PO_4. Die Wasserstoffionenkonzentration dieses Nahrbodens lag bei p_H 5,5 bis 5,6, also beim Wachstumsoptimum der *Oospora*-Stamme in Molke.

Diese in Röhrchen abgefüllten Nährboden wurden vor Gebrauch verflüssigt und nach Abkühlen auf 50° C mit dem zu untersuchenden Zucker versetzt, der zuvor durch einmaliges Sterilisieren im Dampftopf genügend keimfrei gemacht worden war. Nach dem Zufügen des Zuckers wurde der Nährboden in *Petri*-Schalen ausgegossen und mit einer Öse einer wasserigen Aufschwemmung der Kultur, die untersucht werden sollte, beimpft. Es

Tabelle XIII. Assimilation verschiedener C-Quellen durch *Oospora*.

		Oospora-Gruppe „*L*“ Nr 1, 6, 9, 13, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 35, 36, 38, 39	*Oospora*-Gruppe „*M*“ Nr. 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 21, 27, 32, 34, 37
Polysaccharide:	Dextrin	—	+
	Starke (lösl.)	—	+
	Inulin	—	+
Disaccharide:	Saccharose	(+)	+
	Maltose	—	+
	Lactose	—	++
Hexosen:	Dextrose	++	++
	Mannose	+	+
	Galactose	++	++
Pentose:	Rhamnose	—	(+)
Alkohole:	Glycerin	++	—
	Mannit	++	—
Milchsaure Salze:	Ammoniumlactat	++	—
	Natriumlactat	++	—

konnten hierbei mehrere Stämme auf einer Platte untersucht werden, was besonders bei der Untersuchung von seltenen, teueren Zuckern wesentlich war.

Die in Tabelle XIII (S. 91) zusammengefaßten Ergebnisse der Versuche zeigten zwischen den Gruppen „*M*" und „*L*" grundlegende Unterschiede.

Beide Gruppen assimilieren die Spaltungsprodukte des Milchzuckers Galactose und Dextrose, während der Milchzucker nur von den Stämmen der Gruppe „*M*" ausgenutzt werden konnte. Diese Feststellung deckt sich mit Untersuchungsergebnissen von *Lembke* (25) und *Körnlein* (18) bei einigen wenigen Stämmen.

Lactate, die in Form von Ammoniumlactat oder Natriumlactat in der Höhe von 0,1 % den Nährböden zugesetzt wurden, konnten nur von den Stämmen der Gruppe „*L*" assimiliert werden.

Erwähnenswert wäre an dieser Stelle noch das Verhalten der von *Beynum* und *Pette* (4) untersuchten Buttersäurebakterien, welche im Zuckerabbau und Lactatabbau weitgehende Übereinstimmung mit den beiden *Oospora*-Gruppen „*M*" und „*L*" zeigten. Bei den von den beiden Forschern unterschiedenen Gruppen von Buttersäurebakterien, den lactatvergärenden und den zuckervergärenden, zeigten die lactatvergärenden keinen Milchzuckerabbau, die zuckervergärenden dagegen bauten Milchzucker ab, assimilierten aber kein Lactat. Es wäre interessant, festzustellen, ob hier irgendwelche tieferen und allgemeingültigen Zusammenhänge bestehen.

Ist nun der Milchzucker die Quelle der Fettbildung, so ist es leicht verständlich, daß die Stämme der Gruppe „*L*" keine größeren Fettmengen bilden konnten, da dieser Zucker allein in der Molke vorhanden ist. Auch die Förderung der Fettbildung in Mischkulturen bei den Stämmen der Gruppe „*L*" könnte durch die Möglichkeit einer Lactatassimilation zu Fett erklärt werden. Die dennoch vorhandene geringe Fettbildung bei Gruppe „*L*" in Molke wäre dann auf die in jeder Molke vorhandenen Lactate, bzw. auf die durch die Sterilisation der Molke aus den Milchzucker entstandenen Hexosen Galactose und Glucose zurückzuführen.

Die Fettbildung bei den Stämmen der Gruppe „*M*" wäre durch die Fähigkeit der Assimilation des Milchzuckers bedingt, die geringere Fettbildung der Gruppe „*M*" in Mischkultur mit Milchsäurebakterien aber auf die Unmöglichkeit einer Lactatassimilation zurückzuführen. Hierbei könnte einmal das gebildete Lactat hemmend wirken, andererseits würde auch ein großer Teil des Milchzuckers durch Beanspruchung und Vergärung durch die Milchsäurebakterien der Assimilation und Umbildung zu Fett entzogen.

Zur Prüfung dieser Vermutungen und Möglichkeiten erhielt die im allgemeinen etwa 4 % Milchzucker enthaltende Molke einen Zusatz von 1 % Milchzucker bzw. 1 % Galactose oder 1 % Dextrose. Die Zucker wurden wieder, um eine Spaltung weitgehend zu verhindern, gesondert in Leitungswasser sterilisiert durch einmaliges Erhitzen im Dampftopf.

Die Impfung erfolgte mit *Oospora 13, 17* und *23* Gruppe „*L*“ und mit *Oospora 14, 16* und *32* Gruppe „*M*“. Außerdem wurden Kontrollversuche in Molke ohne Zusatz von Zucker angesetzt.

Nach 20tägiger Kulturdauer zeigten die Stämme der Gruppe „*L*“ bei Galactose- und Dextrosezusatz eine, wenn auch nur wenig erhöhte Mycel- und Fettausbeute, dagegen nicht bei Zusatz von Lactose. Die Stämme der Gruppe „*M*“ ergaben bei allen drei Zuckern eine stärkere Fett- und Mycelbildung.

Zur Prüfung der Bildung von Fett aus Lactat wurden 0,5% Natriumlactat (Sirup 60- bis 70%ig, *Schering-Kahlbaum*) der Molke zugefügt. Die dadurch hervorgerufene schwache Sauerung wurde durch Zugabe von einigen Tropfen steriler 4%iger Natronlauge wieder rückgangig gemacht, so daß die Molke des Kontrollversuchs ohne Lactat die gleiche Wasserstoffionenkonzentration von p_H 5,6 aufwies wie die Molke mit Lactatzusatz. 20 Tage nach der Impfung mit den im vorigen Versuch angegebenen Stämmen erfolgte die Fett- und Trockensubstanzbestimmung.

Die Stämme der Gruppe „*L*“ zeigten eine Erhöhung des Trockensubstanz- und Fettgehaltes. Die Stämme der Gruppe „*M*“ dagegen zeigten eine geringere Ausbeute an Fett und Trockensubstanz, es war also durch den Lactatzusatz eine Hemmung eingetreten.

Diese Ergebnisse bestätigten die vorher ausgesprochenen Vermutungen.

Fettbildung bei Oospora in Mischkultur mit Bacterium coli.

Um noch die Einwirkung von *Bact. coli* auf das Fettbildungsvermögen von *Oospora* nachzuprüfen, wurden Mischkulturen mit vier verschiedenen, aus Molkereiabwasser isolierten Stammen von *Bact. coli* durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche, die in der gleichen Weise angestellt wurden wie die Versuche mit den Milchsaurebakterien, waren nicht einheitlich, teilweise waren sogar die Ergebnisse bei den Parallelkulturen einer Serie vollkommen verschieden.

Im allgemeinen war die Sauerung des Nahrbodens bei *Bact. coli* wesentlich geringer als bei den Milchsaurebakterien, in Reinkultur wurde Molke bis p_H 5 gesauert. Oft war die Sauerung so schwach, daß sie von den stark Alkali bildenden Stammen von *Oospora* neutralisiert wurde, so daß schließlich die Wasserstoffionenkonzentration der Molke ins alkalische Gebiet umschlug. Besonders in diesen Fallen trat allgemein eine Wachstumshemmung und geringere Fettbildung bei allen untersuchten Stammen der Gruppen „*M*“ und „*L*“ ein (*Oospora 14, 16, 32, 13, 17, 23*).

Sauerte *Bact. coli* dagegen so stark, daß die Wasserstoffionenkonzentration der Molke bei p_H 5 bis 6 in der Mischkultur mit *Oospora* gehalten wurde, so war bei den Stammen der Gruppe „*L*“ eine geringe Förderung der Fettbildung vorhanden.

Dieses Verhalten ist wahrscheinlich folgendermaßen zu erklären: Bei Gärung in alkalischen Medien neigt *Bact. coli* zur Bildung von Neben-

produkten, besonders Ameisensäure und Essigsäure; bei normalem Gärungsverlauf tritt aber eine Säuerung des Nährbodens ein, und es kommt zu einer weitgehenden Milchsäuregärung. Ameisensäure und Essigsäure sind aber starke Pilzgifte, und ihre Bildung hat wohl die Hemmung des Wachstums und der Fettbildung von *Oospora* in Mischkultur mit *Bact. coli* in schwach alkalischen Nährlösungen zur Folge, während in sauren Medien die durch *Bact. coli* gebildeten Lactate von den Stämmen der Gruppe „*L*" zur Fettbildung benutzt werden.

Fettbildung auf der Käseoberfläche durch Oospora.

Im Zusammenhang mit der Fettbildung durch *Oospora* interessierte es zu untersuchen, ob auch auf der Oberfläche von Weichkäsen die Fettbildung durch *Oospora* so stark sein konnte, daß sich hierdurch der Gesamtfettgehalt des Käses merklich änderte.

Auf allen Weichkäsen findet man *Oospora*, die von vielen Verfassern als nützlich und zur Käsereifung, die hier von außen nach innen erfolgt, als notwendig angesehen wird [*Lang* und *Freudenreich* (23), *Laxa* (24), *Eckles* und *Rahn* (10), *Henneberg* (15) und *Weigmann* (52)]. Auch kann *Oospora* unter Umständen so stark auftreten, daß sie dicke Häute auf der Käseoberfläche bildet und die übrigen Weichkäse-Reifungsorganismen, wie *Bact. linens* und *Penicillium camemberti*, unterdrückt.

Da Weichkäse sehr reich an Molke (Milchzucker) ist, wäre die Möglichkeit starker Fettbildung wohl gegeben.

Zu den Versuchen mußte, um den Fettgehalt der Milch auszuschalten, scharf entrahmte Magermilch verwendet werden, die bei 60 bis 62° C 15 Minuten pasteurisiert und nach Abkühlen auf 37° C mit 100 ccm Saurewecker (*Streptococcus lactis* und *cremoris*) auf 10 Liter Milch beimpft wurde. Dann wurde eine Abschwemmung einer *Oospora*-Kultur der Stämme *13, 17, 23, 14, 16* und *32* zugefügt. Die Stämme waren 3 Tage lang auf Würzeschragagar mit einer Oberfläche von 20 qcm bei 18° C vorgezüchtet. Nach 5 Minuten wurde eingelabt und, als der Bruch nach 50 Minuten brach, geschnitten, verzogen und verschöpft. Die Käseform ergab Käse von der Form der Romadur-Käse (5 : 5 : 12 cm). Die Oberfläche dieser Käse betrug etwa 300 qcm.

Nach 14tägigem Wachstum bildete sich auf der Käseoberflache eine geschlossene Haut von *Oospora*. Bei den Stammen der Gruppe „*M*" war diese Haut etwa 1 bis 2 mm dick (*Oospora 14, 16, 32*), bei den Stämmen der Gruppe „*L*" etwa 0,5 mm (*Oospora 13, 17, 23*). Die Stämme der Gruppe „*M*" zeigten hierbei einen sehr starken Caseinabbau und Verflüssigung des Käses, eine Erscheinung, die bei den Stämmen der Gruppe „*L*" erst viel später eintrat, wobei auch die Verflüssigung weit weniger stark war.

Da nach 14tägigem Wachstum die Reifung des Käses weitgehend fortgeschritten war, wurde nun die *Oospora*-Haut so dünn wie möglich entfernt und das Fett bestimmt. Das in der Haut bestimmte Fett konnte als ausschließlich aus dem Mycel stammend angesehen werden, da der aus Magermilch hergestellte Käse fast fettfrei war, und da die Haut möglichst frei von Käsebestandteilen abgeschält wurde.

Im Innern fand kein Wachstum von *Oospora* statt, die *Oospora*-Zellen der Einsaat erwiesen sich im Käseinnern als fast sämtlich abgestorben; der Käse zeigte deshalb auch nur eine Reifung von außen nach innen.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle XIV und XV angegeben. Aus den Untersuchungen ging hervor, daß die Fettbildung so gering war, daß sie bei vollfettem oder halbfettem Käse kaum ins Gewicht fallen dürfte.

Ein Weichkäse hat, bei einem Gewicht von 156 g, einem Wassergehalt von etwa 60 % und einem Fettgehalt von 45 % etwa 28,1 g Fett, ein Magerkäse bei gleichem Gewicht, gleichem Wassergehalt und einem Fettgehalt von 10 % etwa 6,2 g Fett.

Tabelle XIV. Fettbildung durch *Oospora* auf der Käseoberfläche.

Oospora Nr.	Gruppe	Fettbildung (Mittelwert aus 5 Untersuchungen)	*Oospora* Nr.	Gruppe	Fettbildung (Mittelwert aus 5 Untersuchungen) mg
13	„*L*"	117	*14*	„*M*"	383
17	„*L*"	203	*16*	„*M*"	294
23	„*L*"	134	*32*	„*M*"	327

Tabelle XV. Änderung des Gesamtfettgehaltes bei Weichkäse durch das Wachstum von *Oospora* auf der Käseoberfläche.

Oospora Nr	Vollfetter Käse. Fettgehalt vorher g	%	nachher g	%	Magerkäse Fettgehalt vorher g	%	nachher g	%
13	28,100	45,0	28,217	45,2	6,240	10,0	6,357	10,2
17	28,100	45,0	28,303	45,3	6,240	10,0	6,443	10,3
23	28,100	45,0	28,234	45,2	6,240	10,0	6,374	10,2
14	28,100	45,0	28,483	45,6	6,240	10,0	6,623	10,6
16	28,100	45,0	28,394	45,5	6,240	10,0	6,534	10,5
32	28,100	45,0	28,427	45,5	6,240	10,0	6,567	10,5

Ändert sich diese Fettmenge um die in Tabelle XIV angegebenen Werte, so erfährt die Gesamtfettmenge des Käses eine prozentuale Änderung wie in Tabelle XV angegeben.

Nach diesen Ergebnissen konnte *Oospora* also nicht dazu beitragen, den Fettgehalt des Käses merklich zu erhöhen. Da bei einer Käsefettbestimmung zur Nahrungsmittelkontrolle stets nur der von Rinde befreite Käse untersucht wird, kann die nur an der Oberfläche stattfindende Fettbildung von *Oospora* kein fehlerhaftes (zu hohes) Ergebnis verursachen.

Zusammenfassung.

Die im Abwasser der Molkereien sich vorfindenden verfetteten Pilzmycelien wurden als zur Gattung *Oospora Wallroth* gehörig bestimmt.

Alle isolierten Stämme ließen sich in zwei Gruppen, Gruppe „*M*“ und Gruppe „*L*“, einteilen.

Für Gruppe „*M*“ erwiesen sich folgende Eigenschaften als charakteristisch:

1. Kolonieform bei Züchtung auf 20 %iger Würzegelatine ähnlich *Monilia Pers.*

2. Starker Milcheiweißabbau.

3. Gute *Fettbildung* in Molke, teilweise bis zu 50 % der Trockensubstanz.

4. Geringe Fettspaltung in Vollmilch.

5. Assimiliert Lactose, aber kein Lactat.

6. Die gute Fettbildung in Molke konnte auf die Fähigkeit der Lactose-Assimilation zurückgeführt werden, da durch Zusatz von Lactose, Dextrose und Galactose die Fettbildung gesteigert werden konnte.

7. In Mischkultur mit Milchsäurebakterien zeigte sich eine schlechtere Fett- und Mycelausbeute, weil Lactat nicht assimiliert wurde.

8. Eine Vergrößerung der Kulturoberfläche wirkte sich ungünstig auf die maximale Fettbildung aus.

Gruppe „*L*“ zeigt folgende Eigenschaften:

1. Kolonieform bei Züchtung auf 20 %iger Würzegelatine ähnlich *Oidium lactis Fres.*

2. Geringer Milcheiweißabbau.

3. Schlechte *Fettbildung* in Molke, weniger als 15 % der Trockensubstanz.

4. Starke Fettspaltung in Vollmilch.

5. Assimiliert keine Lactose, aber gute Lactat-Assimilation.

6. Die geringe Fettbildung in Molke beruht auf der Unfähigkeit, Lactose zu assimilieren, die Fettbildung konnte durch Zusatz von Galactose und Dextrose zur Molke gesteigert werden, nicht aber durch Zusatz von Lactose.

7. Die Fettbildung wurde in Mischkultur mit Milchsäurebakterien gesteigert, weil Lactat assimiliert wird.

8. Eine Vergrößerung der Kulturoberfläche bedingte eine geringe Zunahme der maximalen Fettbildung.

Beiden Gruppen ist gemeinsam:

1. Die Fett- und Mycelbildung wurde durch Schütteln oder durch Einblasen von Luft gehemmt; die Fettbildung war bei ruhender Oberfläche am besten.

2. Eine für das Wachstum optimale Wasserstoffionenkonzentration erwies sich auch als optimal für die Fettbildung.

3. Die Mischkultur mit *Bact. coli* zeigte teils hemmende, teils fördernde Wirkung auf die Fettbildung bei *Oospora*. Die hemmende

Wirkung war durch die Bildung von Essig- und Ameisensäure durch *Bact. coli* zu erklären.

4. Das gebildete Fett war als *Degenerationsfett* anzusehen, da es nicht wieder im Stoffwechsel verwendet wurde.

5. Die maximale Fettmenge wurde in Molke nach etwa 70 bis 100 Tagen erreicht.

6. Auf der Oberfläche von Weichkäsen war durch *Oospora* eine geringe Fettbildung möglich, der Gesamtfettgehalt des Käses wurde hierdurch jedoch nicht wesentlich geändert.

Die maximale Mycel- und Fettausbeute bei den gut fettbildenden Stämmen der Gruppe „*M*" betrug im Mittel etwa 3 bis 5 kg Fett, auf 1000 Liter Molke berechnet, bei 10 bis 12 kg Trockensubstanz.

Etwa die gleiche maximale Ausbeute erhielt *Lindner* (30) bei *Endomyces vernalis*, nämlich 4,51 kg Fett je 1000 Liter Sulfitlauge bei 10,08 kg Trockensubstanz.

Das Fett im getrockneten *Oospora*-Mycel wurde durch Ausschütteln des vorher mit 25 %iger Salzsäure hydrolysierten Materials mit Alkohol, Äther und Petroläther bestimmt, da sich alle bisher verwendeten Methoden als unzureichend für eine Erfassung des gesamten Fettgehaltes oder als zu umständlich für Massenuntersuchungen erwiesen hatten. Die Methode der Fettbestimmung wurde, ebenso wie die der Trockensubstanzbestimmung, eingehend begründet und beschrieben.

Literatur.

1) *Baillière, Tindall* u. *Cox*, Industrial Microbiology. London 1930 (S. 179). — 2) *Barber, H. H.*, Biochem. J. **23**, 1158, 1929. — 3) *Bary, A. de*, Vergleichende Morphologie der Pilze, S. 7. Leipzig 1884. — 4) *Beynum, J.*, u. *Pette, J. W.*, Centralbl. f. Bakt. II, **93**, 198, 1935. — 5) *Bobilioff-Preisser, W.*, ebenda II, **46**, 424, 1916. — 6) *Bondzynski, St.*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **33**, 186, 1894.

7) *Damm, H.*, Bisher unveröffentlichte Untersuchung aus dem Bakt. Inst. d. Vers.- u. Forsch.-Anstalt f. Milchwirtschaft in Kiel. — 8) *Daubney, C. G.*, u. *Mac Lean, J. S.*, Biochem. J. **21**, 373, 1927. — 9) *Delbrück, H.*, Tageszeitung f. Brauerei, S. 875, Berlin 1915.

10) *Eckles, C. H.*, u. *Rahn, O.*, Centralbl. f. Bakt. II, **14**, 680, 1905.

11) *Farnsteiner, K.*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **7**, 105, 1904.

12) *Gottlieb, E.*, Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen **40**, 1, 1892. — 13) *Grimmer, W.*, *Bodschwinna, W.*, u. *Lignau, E.*, Milchwirtschaftl. Forschungen **1**, 374, 1924.

14) *Haehn, H.*, u. *Kinttof, W.*, Chem. d. Zelle u. Gewebe **12**, 115, 1925. — 15) *Henneberg, W.*, Deutsch. Milchwirtsch. Ztg. **30**, 73, 1925. — 16) *Derselbe*, Bakteriologische Molkereikontrolle, S. 3, Berlin 1934.

17) *Janke, A.*, Allgem. techn. Mikrobiol. **1**, 257, 1924.

18) *Körnlein, Max*, diese Zeitschr. **7**, 359, 1936 (Dissertation Kiel 1936: „Die Flora des Milchzuckerabbaues bei der Reinigung von Molkereiabwasser"). — 19) *Kordatzki, W.*, Taschenbuch d. prakt. p_H-Messung, S. 141,

München 1935. — 20) *Kramer, E.*, Arch. f. Hyg. 20, 197, 1894. — 21) Kriegsausschuß f. pflanzl. u. tier. Öle u. Fette; a) DRP. 305091, Kl. 53h; b) DRP. 306365, Kl. 53h; c) DRP. 307789, Kl. 53h; d) DRP. 309266, Kl. 53h; e) DRP. 310616, Kl. 53h; f) DRP. 320560, Kl. 53h; g) DRP. 332411, Kl. 53h.

22) *Laborde, M. J.*, Annales de l'Institut Pasteur 11, 36, 1897. — 23) *Lang, M.*, u. *Freudenreich, E. von*, Landw. Jahrb. d. Schweiz 7, 229, 1893. — 24) *Laxa, O.*, Milchwirtsch. Zentralbl. 1907, Heft 5. — 25) *Lembke, A.*, Dissertation Kiel 1933: „Biologische Untersuchungen über Sauermilchquarg mit besonderer Berücksichtigung der Oosporagruppe." — 26) *Lindner, P.*, u. *Unger, T.*, Zeitschr. f. techn. Biol. 7, 68, 1919. — 27) *Lindner, P.*, ebenda 7, 79, 1919. — 28) *Derselbe*, Wochenschr. f. Brauerei 87, 285, 1920. — 29) *Derselbe*, Zeitschr. f. techn. Biol. 9, 100, 1921. — 30) *Derselbe*, Chem. Ztg. 114, 855, 1922. — 31) *Derselbe*, Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle im Gärungsgewerbe, S. 272, 1930. — 32) *Linneboe, J. B.*, u. *Hastings, E. G.*, Centralbl. f. Bakt. II, 98, 278, 1936.

33) *Marschall, Dr.*, Arch. f. Hyg. 28, 16, 1897. — 34) *Mellanby, J. M.*, u. *Woolley, A.*, J. of Phys. 48, 287, 1914. — 35) *Meubrink, H.*, Dissertation Kiel 1927: „Bakteriologische Studien unter besonderer Berücksichtigung der Aromafrage bei Margarine."

36) *Nägeli, C. von*, Sitzungsber. d. Kgl. bayr. Akad. d. Wissensch., Math.-physik. Kl., S. 287, 1879.

37) *Orla-Jensen, S.*, Dairy bacteriology. London 1921.

38) *Perrier, M. A.*, C. r. 140, 1052, 1905.

39) *Rabenhorst, L.*, Kryptogamenflora, Abt. VIII, 1, 1904. — 40) *Ratzlaff, E.*, Milchzeitung 32, 65, 1903. — 41) *Rippel, K.*, diese Zeitschr. 2, 72, 1931. — 42) *Ritter, U.*, Dissertation Kiel 1930: „Über *Oospora*-Rassen aus Milch und Milcherzeugnissen." — 43) *Röse, Br.*, Zeitschr. f. angew. Chem. 2, 100, 1888. — 44) *Ruppel, Fr.*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 45, 112, 1906.

45) *Schmid, W.*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 27, 464, 1888. — 46) *Schnell, Erwin*, Centralbl. f. Bakt. II, 35, 1, 1912. — 47) *Schwartz, W.*, u. *Kautzmann, R.*, diese Zeitschr. 2, 537, 1931. — 48) *Schwarz, Georg*, Deutsch. Molkereiztg. 1935, Festschr. v. 28. Mai. — 49) *Sorauer, P.*, Handb. d. Pflanzenkrankheiten 3, 582, 1932.

50) *Völtz, W.*, Pflügers Arch. 97, 606, 1903.

51) *Ward, G. E.*, *Lockwood, L. B.*, *May, O. E.*, u. *Herrik, H. F.*, Industrial and Engineering Chemistry (Industrial Edition) 1935, S. 318. — 52) *Weigmann, H.*, Handb. d. prakt. Käserei, 4. Aufl., S. 279. Berlin, 1933.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Universität in Prag und aus der Biologischen Station in Lunz, Österreich.)

Beitrag zur Kenntnis der Athiorhodobakterien-Gesellschaften.

Von

V. Czurda und E. Maresch (Prag).

(Eingegangen am 12. Februar 1937.)

Der Formenreichtum der *Athiorhodobakterien*-Gesellschaften[1] ist noch nicht genügend untersucht worden. Es sind meist nur einzelne Glieder dieser Biocoenose zu wichtigen physiologischen oder biochemischen Untersuchungen verwendet worden, und diese wurden auf Grund einer gewissen Übereinstimmung mit einer der bekannten, meist nicht hinreichend definierten Arten dieser oder jener zugezählt. Es scheint nicht hinreichend untersucht zu sein, ob die verwendeten Organismen identisch waren, oder ob es nicht mehrere morphologisch ähnliche oder gleiche, physiologisch aber verschiedene Vertreter in dieser Gesellschaft gibt, die auf Grund einer unzureichenden morphologischen Charakteristik einer Art (Sammelart) zugeordnet worden sind.

Durch die biochemischen Untersuchungen von *van Niel*, *Müller* und *Gaffron* ist ein wesentlicher Teil des Stoffwechsels, das Vermögen der CO_2-Assimilation, bei einigen Vertretern geklärt. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend konnte daran gegangen werden, die leicht gewinnbaren roten Gesellschaften in ihrer Zusammensetzung und ihrer Verbreitung — ökologisch — zu studieren. Es war klar, daß trotzdem noch nicht alle Schwierigkeiten der Kulturmethodik beseitigt sein müßten. Ein Hinweis auf die Grünalgen genügt, um zu zeigen, wie trotz der gleichbleibenden Art und Weise des Kohlenstoffgewinnes doch noch eine so große Mannigfaltigkeit der ökologischen Ansprüche der Einzelformen vorkommen kann, daß nur ein Teil von ihnen heute einer sicheren Kultur zugänglich ist.

Mit freien Augen erkennbare *Athiorhodobakterien*-Gesellschaften, also Biocoenosen, in denen diese Organismen vorherrschen, scheinen in der Natur selten zur Ausbildung zu gelangen, jedenfalls viel seltener als solche von *Thiorhodobakterien*. Die Keime sind aber, wie bekannt, in der Natur allenthalben, auch in der Luft, anzutreffen. Auch wir haben auffallende Bestände noch nicht gesehen, wenn wir von jenen Bakteriengesellschaften absehen, die besser als solche von *Athiorhodobakterien* als von *Thiorhodobakterien*, wie es bisher geschehen ist,

---

[1] In der Bezeichnungsweise schließen wir uns dem Vorgange von *Bavendamm* (1936, S. 48) an.

anzusprechen wären, weil in ihnen schwefelfreie Purpurbakterien jedenfalls der Zahl nach überwiegen. Wenn hier von *Athiorhodobakterien*-Gesellschaften die Rede ist, so sind damit jene Gesellschaften gemeint, welche man mühelos und sicher in künstlich angelegten und belichteten Lebensräumen gewinnen kann.

Anreicherungsverfahren.

Zur Anreicherung von *Athiorhodobakterien* wurden zunächst die bekannten Verfahren [*Molisch* (1907), *Buder* (1919), *Schneider* (1930)] benutzt.

1. Es wurden in kleine Stücke zerschlagene Rinderknochen in hohen Zylindern mit Schlamm, Sand und Leitungswasser überschichtet. Auch die mit Sand und Schlamm nicht beschickten Gefäße zeigen in wenigen Tagen eine Entwicklung roter Organismengesellschaften. Zwecks Ausschlusses der in der Luft, auf den Knochen und im Leitungswasser befindlichen Keime von *Athiorhodobakterien* ist Sterilisation notwendig, damit nur die aus dem Impfmaterial stammenden Keime angehen.

2. Hohe Zylinder wurden mit 1 %iger *Witte*-Peptonlösung in Leitungswasser angefüllt, sterilisiert und mit der Schlammprobe versetzt.

3. Die in hohen Zylindern untergebrachte Schlammprobe wurde mit gefälltem Calciumcarbonat vermengt und mit einer 0,1 %igen Ammonsulfatlösung überschichtet. Diese Anordnung führt zur Anreicherung schwefelführender Purpurbakterien (*Thiorhodobakterien*). Aber in ihrer Gesellschaft finden sich immer auch *Athiorhodobakterien*.

Die auf diese Weise vorbereiteten Anreicherungskulturen wurden in einem Lichtkasten [s. *Schneider* (1930), *van Niel* (1931), *Schrammeck* (1934)] bei durchschnittlich 30° C untergebracht und dauernd beleuchtet.

Ein Teil der Kulturen wurde mit Paraffinöl überschichtet. In den Zylindern ohne Ölabschluß ist zwar, soweit es die mikroskopische und kulturelle Untersuchung erkennen läßt, die gleiche *Athiorhodobakterien*-Gesellschaft aufgekommen, aber sie kommt langsamer zur Entwicklung und führt nicht zur Besiedlung des ganzen Wasserraumes. Sehr häufig gewinnen anfangs die farblosen Bakteriengesellschaften die Oberhand, so daß die Entwicklung einer roten Gesellschaft vollkommen unterbleibt. Schon nach 4 bis 6 Tagen der ersten Passage zeigen Schlammproben bestimmter Herkunft eine Vegetationsfärbung. Bei manchen dauert es länger. Aus einer ganzen Reihe von Materialien kalkarmer Standorte konnten *Athiorhodobakterien* bisher überhaupt nicht angereichert werden.

Die einmal aufgetretene blutrote Vegetationsfärbung bleibt in der ersten und zweiten Nährlösung (mit Eiweiß) monatelang erhalten, eine Dauer, die sehr überrascht. Die sie hervorrufende *Athiorhodobakterien*-Gesellschaft macht aber während dieser Zeit einen Wechsel ihrer Zusammensetzung durch. Es gelingt, durch zu verschiedenen Zeiten gemachte Überimpfungen in entsprechend vorbereitete und sterilisierte Kulturröhren dem einen oder dem anderen Vertreter der

Gesellschaft zur Vorherrschaft zu verhelfen, ein Umstand, der den Erfolg der Analysier- und Isolierungsarbeiten wesentlich unterstützt.

Welche der *Athiorhodobakterien* in der ersten Passage bestandbildend auftritt, hängt offenbar in erster Reihe von der Besiedlungsweise der Schlammprobe und von dem Zustand der darin befindlichen Organismen ab. Nicht selten erscheinen in den einzelnen Zylindern einer Reihe gleichartig vorbereiteter Anreicherungskulturen verschiedene Leitformen der Biocoenose. Es eignen sich daher die Anreicherungskulturen in der angegebenen Form nicht ohne weiteres zur Untersuchung der Verbreitung der Gruppe in der Natur, was übrigens auch eine nähere Überlegung ergibt. Nur das wiederholte Ausbleiben solcher Formen in Schlammproben bestimmter Herkunft kann als zuverlässiges Ergebnis angesehen werden.

Dafür spricht noch eine weitere Beobachtung, die oben schon berührt worden ist. Selbst die dichteste Population von *Athiorhodobakterien* einer späteren Passage, die schon in 3 bis 4 Tagen zu einer blutroten Vegetationsfärbung geführt hat und die bei mikroskopischer Betrachtung einheitlich aussieht, erweist sich bei der weiteren Analyse oft noch reichlich vermischt mit farblosen oder anders gefärbten, grünen und gelben Bakterien und auch mit Algen. Da die ökologischen Verhältnisse der Eiweißzersetzung einer solchen Anreicherungskultur sehr unübersichtlich sind, müssen noch weitere Beobachtungen gesammelt werden, ehe ein Überblick über die Mannigfaltigkeit der Gruppe erzielt sein wird.

Außerordentlich überraschend war es, daß Vertreter der *Athiorhodobakterien* in den Ammonsulfat-Anreicherungskulturen in solcher Menge vorkommen, daß ein größerer Teil der Vegetationsfärbung von ihnen herrührt. Während in der ersten Passage solcher Kulturen noch genügende Mengen organischer Substanzen in der Schlammprobe zur Ernährung der schwefelfreien Purpurbakterien vorhanden sein dürften, fehlen solche in den nur mit anorganischen Salzen hergestellten Lösungen, die zur Weiterzucht von schwefelspeichernden Purpurbakteriengesellschaften (*Thiocystis*, *Chromatium*) benutzt werden. Und trotzdem herrschen die *Athiorhodobakterien* in solchen Kulturen, wenigstens in manchen Reihen, anscheinend auf Kosten des Zelleiweißes autolysierter schwefelspeichernder Purpurbakterien so vor, daß bei der Keimanalyse eines Tropfens einer 2-mm-Öse mittels des *Koch*schen Plattengußverfahrens die Verdünnung ungewöhnlich weit (6 bis 8 Verdünnungen) getrieben werden muß, um abimpfbare Kolonien zu erhalten. Die himbeerwasserartige Vegetationsfärbung, welche sich in solchen Kulturen in 3 bis 5 Tagen einstellt, ist oft nur von *Athiorhodobakterien* (*Rhodopseudomonas Nr. 16*)[1] hervorgerufen.

[1] Bezüglich der Benennung siehe Anmerkung auf S. 119.

4. Bei Versuchen zur Anreicherung von *Thiorhodobakterien* in synthetisch hergestellten Mineralsalzlösungen mit n/5000 H_2S und 0,1 % $NaHCO_3$, unter Luftabschluß (s. *van Niel*) wurden wenigstens in der 1. Passage arten- und individuenreiche *Athiorhodobakterien*-Gesellschaften ziemlich gleichbleibender Zusammensetzung aufgefunden, so daß auch dieses Verfahren zur Anreicherung dienen kann.

Isolierungsverfahren.

Zur Trennung der einzelnen Glieder der in den Anreicherungskulturen vorliegenden Gesellschaften wurde zunächst das *Koch*sche Plattenverfahren mit verschiedenen Abänderungen versucht, die die chemische Zusammensetzung des Nährbodens (Pepton-, Mineralsalzagar), die O_2-, CO_2- und H_2S-Tension betrafen.

Anfangs benutzte Verfahren.

1. Anaerobe, CO_2-freie Plattenkulturen nach *Itano* und *Arakawa* (1932) mit Pyrogallol und Kalilauge, welche sich für raschwüchsige Organismen, die in 4 bis 5 Tagen sichtbare Kolonien ergeben, gut eignen. Bei längerer Bebrütung ist der Nährboden bereits zu sehr eingetrocknet.

2. Plattenkultur unter Glocken, welche nach Entfernung der berechneten Luftmenge und Auffüllung mit Wasserstoff oder Stickstoff [siehe *Schneider* (1930)] mit einer verschiedenen O_2- und CO_2-Tension versehen sind. Eine Schwierigkeit war die Blasenbildung im Agar bei weitgehendem Auspumpen. Um sie zu vermeiden und dennoch den Sauerstoff zu entfernen, mußte die Glocke zwei- bis dreimal auf bloß 100 mm in Zeitabständen von 12 bis 24 Stunden ausgepumpt und jedesmal mit O_2- und CO_2-freiem Füllgas (H_2 oder N_2, Pyrogallol-Kalilauge-Batterie) aufgefüllt werden. Zwecks völliger Entfernung des O_2 wurden nach der zweiten bzw. dritten Füllung die anfangs mit untergebrachten Pyrogallol- und Kalilaugelösungen vermengt.

3. Manche Formen wuchsen aber bei keiner dieser Anordnungen an. Es wurden daher Hochschichtröhrchen beimpft, indem steigende Verdünnungen der Keimeinsaat in Röhrchen mit flüssigem Peptonagar gemacht und das Agar ohne weitere Zusätze nach dem Erstarren mit festem Paraffin übergossen wurde. Darin wuchsen die Bakterien in 2 bis 3 Wochen zu sehr großen Kolonien von 0,5 bis 1,5 cm Durchmesser heran. Durch richtige Auswahl der Röhrchen solcher Reihen kann man allerdings bei großem Materialverbrauch Reinkulturen gewinnen. Mit diesem Verfahren sind in den ursprünglichen Gemischen Formen gefunden worden, die im Plattenverfahren mit teilweiser oder „gänzlicher“ O_2-Entfernung niemals zur Entwicklung gekommen sind und sich daher dem Nachweis entzogen hätten. Das Verfahren hat ferner den Vorteil, daß die Kulturen lange halten, so daß auch die Aufzucht langsamwüchsiger Formen ermöglicht wird.

Die Wiederholung eines solchen Hochschichtgusses mit Keimmaterial einer Kolonie aus einer vorausgegangenen derartigen Kultur bringt nicht immer den gleichen Erfolg wie im ersten Guß. Mit dem Ausgangsgemisch, in dem noch andere Bakterien vorhanden sind, wird das Substrat durch ihren Stoffwechsel für die Entwicklung der *Athiorhodobakterien* vorbereitet. Die gleichen Beobachtungen machten wir zuweilen beim Anlegen eines zweiten Plattengusses von Zellmaterial, das von rein aussehenden Kolonien des ersten Plattengusses stammte.

Ein neues Verfahren.

Die Fortführung der Anreicherungs- sowie Reinkulturen war lange trotz der verschiedensten Bemühungen ziemlich unsicher geblieben. Ein Grund hierfür konnte nicht gefunden werden (s. unten S. 107 ff.), wenigstens nicht in der Zusammensetzung des Nährsubstrates. Daher wurde, nachdem schon eine Reihe von verschiedenen *Athiorhodobakterien* isoliert war, nach einer Methode gesucht, die vom Beginn des Versuches an, anaerobe Bedingungen schafft, ohne gleichzeitig die übrigen anfänglichen Eigenschaften des Lebensraumes (Reaktion, Wasserdampf-, Kohlensäuretension) zu verändern. Das schon von *van Niel* angewendete Verfahren, bei dem der Sauerstoff durch Na_2S entfernt wird, wurde auch hier als Hochschicht- und Plattenguß [*Czurda* (1936)] versucht. Es wurde in Übereinstimmung mit den Beobachtungen und Stoffwechseluntersuchungen von *van Niel*, *Müller* und *Roelofsen* zur Isolierung und Fortzucht von *Athiorhodobakterien* mit Erfolg verwendet.

Die Einrichtung der völligen O_2-Freiheit der Substrate hat, besonders beim Isolierverfahren, unter anderem den Vorteil, daß unter den vielen Begleitorganismen die obligat aeroben, wenigstens in den ersten Tagen, völlig in ihrer Entwicklung gehemmt werden, so daß die zur strengsten Anaerobiose befähigten Bakterien, darunter in erster Linie die *Athiorhodobakterien*, einen ausreichend großen Vorsprung gewinnen können. Später allerdings können sich, wie man noch sehen wird, auf Kosten des von *Athiorhodobakterien* unterdessen ausgelösten Stoffwechsels auch aerobe Keime entwickeln.

Das Verfahren zur Isolierung besteht in einer Abänderung des üblichen *Koch*schen Plattengußverfahrens mit fortschreitender Verdünnung der Keimeinsaat. Vor seinem Erstarren wird der Peptonnährboden (p_H 5,2 bis 7,0) mit einem frisch bereiteten H_2S-Wasser so versetzt, daß er ungefähr n/1000 H_2S enthält.

Für die Ausführung bereitet man sich durch Einleiten von H_2S in keimfreies Wasser die nötige Lösung, deren Gehalt durch Titration mittels n/100 Jodlösung ermittelt wird. Werden 10 ccm der Jodlösung, welche mit Stärke als Indikator gefärbt ist, eben durch 10 ccm H_2S-Wasser entfärbt, so genügt der Zusatz von 1 ccm H_2S-Wasser zu 10 ccm Nährboden, um das dem Nährboden zugesetzte Indigkarmin (0,0005 %) im Verlaufe von 1 bis 3 Minuten eben noch völlig zu reduzieren. Die in diesem Wasser enthaltene H_2S-Menge genügt berechnungsmäßig zur Entfernung jener O_2-Menge, die in 10 ccm reinen Wassers von 22° C im Gleichgewichtszustand mit der Luft enthalten ist. Findet man bei der Titration einen größeren oder kleineren H_2S-Gehalt, so wird entsprechend mehr oder weniger zugesetzt. Da der Nährboden infolge des vorherigen Aufkochens einen geringeren O_2-Gehalt aufweist als den, der der Zimmertemperatur entspricht, so ist ein kleiner Überschuß von H_2S vorhanden. Dieser ist unbedenklich, da auch ein 100 %iger Überschuß noch unschädlich ist. Der Überschuß an H_2S verringert sich übrigens noch durch Oxydation beim Zubereiten der Kulturen.

Der Überschuß kann daher das Ein- bis Zweifache der oben genannten notwendigen Menge betragen, ohne das Angehen der Kulturen zu sehr zu hemmen. Ein Vertragen von hohen H_2S-Konzentrationen, das *Gaffron* (1933) angibt, konnte an keinem unserer Stämme beobachtet werden. Denn ein größerer Überschuß als das Doppelte der obigen Menge (n/2000 H_2S) erweist sich *in der Reinkultur* als giftig.

In den beimpften, zu flacher Schicht ausgegossenen und O_2-frei gemachten Nährboden dringt in kurzer Zeit wiederum O_2 ein, wodurch es bei längerem Stehenlassen (eine bis mehrere Stunden) zu einer milchigen Trübung des Substrates (S_2-Fällung) kommt. Ein derartiges Substrat wirkt außerordentlich bakteri- und fungicid. Nur ganz wenige Organismen der *Purpurbakterien*-Gesellschaften (*Phaeomonas Nr. 23*) vermögen darin bei O_2-Gegenwart (!) zu gedeihen. Um den H_2S-Verlust und die Schwefelbildung im Substrat zu vermeiden, werden die *Petri*-Schalen nach dem Erstarren der Agarschicht mit einer größeren Menge ebenso vorbereiteten H_2S-haltigen Nährbodens, der aber unbeimpft bleibt, so angefüllt, daß das Substrat durch eine darüber geschobene Glasplatte an Stelle des Deckels luftblasenfrei abgeschlossen werden kann. Nach Entfernung des überschüssigen und außen erstarrten Agars wird die Schale mit Gelatinelösung (5 bis 10 %) gegen die Glasscheibe abgedichtet.

In 5 bis 8 Tagen erscheinen die abimpfbaren Kolonien in der Kulturschicht, welche bei dünner Aussaat (etwa 10 Kolonien je Platte) in 3 bis 4 Wochen bis zu 5 bis 10 mm großen Kolonien heranwachsen können. Nach Entfernung der Glasscheibe (Abziehen) wird durch die unbeimpfte Deckschicht hindurch mittels Kapillaren das gewünschte Keimmaterial von den Kolonien abgenommen.

An Stelle des H_2S ist auch das von *van Niel* eingeführte $Na_2S + 9 H_2O$ verwendbar, das auch dort, wo die Laboratoriumsapparatur für Herstellung und Titration des H_2S-Wassers nicht zur Verfügung steht, solche Versuche vorzunehmen erlaubt. Die Zusätze werden am besten so eingerichtet, daß das Kultursubstrat 0,012 % oder bloß die Hälfte davon enthält.

Anfangs wurden in Anlehnung an die Erfahrungen von *Molisch* und *Schneider* Peptonnährböden zur Isolierung verwendet. Später wurde der für schwefelführende Bakterien (*Chromatium*) geeignete Mineralsalzagar [*Czurda* (1936a)] mit dem obigen Schwefelwasserstoff- und Indigkarminzusatz verwendet. In einer Richtung war er vorteilhafter als der Peptonnährboden.

Die in den *Athiorhodobakterien*-Gesellschaften meist vorhandenen schwefelspeichernden Bakterien verbrauchen in den ersten 3 Tagen den H_2S. Das zugesetzte Indigkarmin zeigt sein Verschwinden durch Wiederauftreten der blauen Farbe an. Vor dem Verschwinden des H_2S erscheinen schon die *Athiorhodobakterien*- und *Grünbakterien*-Kolonien,

deren weitere Entwicklung nach dem Farbumschlag in verstärktem Maße einsetzt und zu 5 bis 8 mm großen Kolonien führen kann. Nach dem Farbumschlag setzt die Entwicklung anderer Organismen ein, die braunrot gefärbt sind. Auch neue rote Kolonien erscheinen erst in dieser Phase der Kultur. Der Vollständigkeit halber sei noch ein farbloses großes Stäbchen dieser Gesellschaft erwähnt, das regelmäßig nachweisbar ist und in diesen Versuchen mit *Chromatium* gleichzeitig zur Entwicklung gelangt. Im Gegensatz zu den Peptonnährböden gelingt also mit diesem Mineralsalzagar die Darstellung aller im ursprünglichen Lebensraum vorhandenen Keime in einem Einzelversuch nebeneinander, so daß schon mit diesen Versuchen die Häufigkeit einer jeden Keimart des Ausgangsgemisches ermittelt werden kann.

Die isolierten Organismen und ihr kulturelles Verhalten.

Aus den Anreicherungskulturen wurden mit dem einen oder dem anderen Verfahren gewöhnlich mehrere Stämme von rot oder grün gefärbten Bakterien isoliert und ein Vergleich des Verhaltens der Stämme eines Ausgangsmaterials untereinander, sowie ein Vergleich mit den aus anderen Ausgangsmaterialien und mit anderen Isolierungsverfahren gewonnenen Stämmen vorgenommen. Von den im Laufe der Zeit in Reinkultur gewonnenen und untersuchten Stämmen gefärbter Bakterien der *Athiorhodobakterien*-Biocoenose können bis jetzt folgende Stammgruppen deutlich unterschieden werden:

1.	Stammgruppe	*Rhodopseudomonas*	*Nr. 1*
2.	,,	,,	,, *9*
3.	,,	,,	,, *16*
4.	,,	*Phaeomonas*	,, *14*
5.	,,	,,	,, *23*
6.	,,	*Rhodospirillum*	,, *1*
7.	,,	*Chloropseudomonas nov. gen.*	,, *1*

Die Stämme der einzelnen Gruppen gehen auf verschiedene Ausgangsmaterialien zurück. Sie wurden durchweg erst durch ein Anreicherungsverfahren mit Pepton, nicht durch direkten Plattenguß in den Schlammproben aufgefunden. Daher kann über Menge, Verbreitung und Beschaffenheit in der Natur noch nichts Genaueres ausgesagt werden. Bei der Analyse von *Thiorhodobakterien*-Gesellschaften in Süßwasser (Lunz, Österreich) wurden ein *Rhodopseudomonas* und ein *Rhodospirillum* gefunden, die, im Gegensatz zu den in den gleichen Kulturen vorhandenen anderen roten Vertretern, innerhalb der anders beschaffenen Kolonien und in ihrer nächsten Umgebung aus dem H_2S den Schwefel in Tröpfchenform abscheiden wie etwa mitanwesende Grünalgenkolonien. Diese beiden Organismen werden in folgendem noch nicht berücksichtigt. Man ersieht aus diesem Befund, daß die

Reihe der hierher gehörigen Bakterien mit der oben aufgezählten Gruppe nicht erschöpft sein dürfte.

Für Anreicherungskulturen wurden verwendet: Faulschlamm des Kuchelbader Waldteiches bei Prag (*Rhodopseudomonas Nr. 1, Phaeomonas Nr. 14, Nr. 23, Rhodospirillum Nr. 1, Chloropseudomonas nov. gen. Nr. 1*), Faulschlamm mit reicher Schwefelbakteriengesellschaft aus dem Teichabfluß nächst Jewan bei Prag (*Rhodopseudomonas Nr. 9*), Sulfitabwässer der Papierfabrik Weißwasser bei Hirschberg in Böhmen, faulendes *Sphagnum* von Kummer bei Hirschberg i. B. und Schlamm vom Musikantenteich ebendort. Schlamm des Schloßteiches (*Lamprocystis*), der Fischteiche, des Kanals und Kanaleinflusses im Untersee in Lunz (Österreich), Material aus Anreicherungskulturen, welches wir der Freundlichkeit der Herren Prof. *K. Noack* in Berlin (*Rhodopseudomonas Nr. 9*) und *Gaffron* in Berlin verdanken (*Rhodopseudomonas Nr. 1, Nr. 16, Phaeomonas Nr. 14* und *Chloropseudomonas Nr. 1*).

Da die Ernährungsphysiologie der isolierten Stämme noch nicht entsprechend geklärt ist, bleibt vorderhand unbekannt, welche der noch isolierten Stämme zusammengehören. Vor einer Zusammenziehung aller dünnstäbchenförmigen Organismen warnen gewisse Unterschiede quantitativer Art. Es ist deshalb auch ungewiß, ob uns nicht noch verschiedenen *Athiorhodobakterien* in diesen Anreicherungskulturen entgangen sind, weil die bisher angewendeten Methoden für ihre Anreicherung und Kultur ungeeignet waren. Bei allen genannten Stammgruppen handelt es sich um Süßwasserformen. Das vergleichend untersuchte *Rhodospirillum rubrum Esmarch*, das wir aus der Sammlung *Přibram*, Wien, und von der National-Collection of Type cultures in London erhalten haben, stellt ein achtes Glied der *Athiorhodobakterien*-Gesellschaft dar.

Nährboden.

Die auf die eine oder andere Weise isolierten Organismen wurden zunächst auf dem gleichen Nährboden, mit welchem die Isolierung gelungen war, und von dem noch die Rede sein wird, in sonst verschiedener Anordnung (als Ausstrichkultur oder Strichkultur auf schräg erstarrtem Agar, als Stichkultur in Hochschicht oder als Schüttelkultur in Hochschicht) bei einer 21, 5,5 und 1 % O_2 entsprechenden Tension im Anschluß an die Erfahrungen von *Schneider* (1930) und bei einer Temperatur von 25 bis 30° C im Dauerlicht eines Lichtkastens gehalten. Es wurden 15 bis 20 Röhrchen in 10-Liter-Glocken, die mit dem von *Schneider* angegebenen Gummikitt abgedichtet waren, untergebracht und die darin befindliche Gasatmosphäre durch teilweises Auspumpen der Luft (auf 200 mm und 40 mm Druck) und Auffüllung mit N_2 bzw H_2 ungefähr auf den O_2-Gehalt gebracht, der oben genannt worden ist (5,5 bzw. 1 % O_2). Manche Stämme sind auf diese Weise über zwei Jahre bis heute fortgeführt worden. Trotz Einhaltung der in den ersten Ver-

suchen als geeignet erkannten Anordnung (Impfweise, O_2-Tension), sind jedoch die Wiederholungen öfters nicht von gleichem Erfolg wie zuvor begleitet gewesen, so daß die Fortführung der Stämme ständig mit einer gewissen Unsicherheit verbunden gewesen ist. Sie konnte nur durch Anlegen mehrerer gleichartiger Kulturen überwunden werden. Auch die Änderung der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens und des p_H-Wertes hat keinen besseren Erfolg gebracht. Daher soll auf diese Einzelheiten nicht näher eingegangen werden.

Für eine erfolgreiche Fortzüchtung (*Rhodopseudomonas Nr. 1, 9, 16, Phaeomonas Nr. 14* und *Rhodospirillum Nr. 1*) mußte der Nährboden unbedingt 1 % Pepton enthalten, eine Feststellung, die sich mit der von *Molisch* (1907), *Schneider* (1930) und *Müller* (1933) deckt. *Phaeomonas Nr. 23* bildet insofern eine Ausnahme, als es, wie noch ausgeführt werden wird, nur auf Mineralsalznährböden gedeiht. Ein Zusatz von 1 % Glycerin oder 1 % Glucose hat sich bei den Kulturen unter vermindertem O_2-Druck zwar als zweckmäßig erwiesen, jedoch keine auffallende Steigerung der Vermehrungsintensität oder des Ertrages herbeigeführt. Die Notwendigkeit des Peptons hat zu der seit *Molisch*s Untersuchungen allgemein vertretenen Vorstellung [s. *van Niel* und *Müller* (1931), *Gaffron* (1933, S. 3), *Roelofsen* (1935, S. 1)] geführt, daß die *Athiorhodobakterien* obligat heterotrophe Organismen seien. Durch den Nachweis der CO_2-Assimilation seitens *Gaffron*s hat der Sinn des weiterhin beibehaltenen Ausdruckes „Heterotrophie" einen wesentlichen Wandel erfahren (s. S. 113).

Versuchsreihe 1. Wegen der wechselnden Erfolge mit dem anfänglich verwendeten *Witte*-Pepton wurden verschiedene andere Peptone versucht, zumal sich *Witte*-Pepton für die Stammgruppen *Rhodopseudomonas Nr. 1* und *Chloropseudomonas Nr. 1* nicht besonders zu eignen schien. Außer diesem Pepton sind daher noch Pepton *Vaillant* (Pepton Bacteriologique 5 C), Neopepton Difco, Proteosepepton Difco, Bactotrypton Difco und Fleischextrakt *Liebig* als Nährstoffe versucht worden. Von diesen hat sich für die Stammgruppe *Rhodopseudomonas Nr. 1, 9, 16* und *Rhodospirillum Nr. 1* bei Kultur unter verminderter O_2-Tension (Strich- und Ausstrichkultur) am besten das Pepton *Vaillant* als 1 %iger Zusatz bewährt. Die Reaktion dieses Substrates bewegt sich zwischen $p_H = 5{,}2$ bis 5,3. Für die Stämme von *Phaeomonas Nr. 14*, besonders unter anaeroben Verhältnissen, und *Rhodospirillum rubrum* hat sich das neutral reagierende *Witte*-Pepton als 1 %iger Zusatz mit einem solchen Zusatz des sauer reagierenden, aber neutralisierten Fleischextraktes *Liebig* weit besser bewährt. Aus auffallender Förderung der Vermehrung der *Athiorhodobakterien* durch Kolonien farbloser Organismen, die bei dem Isolierverfahren oft beobachtet werden konnte, wurde geschlossen, daß irgendwelche Abbauprodukte der Peptone die gesuchten

Nährstoffe wären. Deshalb wurde anfangs auch versucht, mit Reinkulturen verschiedener farbloser Bakterien aus der *Athiorhodobakterien*-Biocoenose aus *Witte*-Peptonkulturen mittels Bakterienfilter bakterienfreie Abbauflüssigkeiten zu gewinnen, die ein besseres Wachstum der gefärbten Bakterien herbeiführen sollten. Diese Bemühungen waren entweder ganz ohne oder doch ohne sicher wiederholbaren Erfolg, wenn auch mitunter eine auffallende Förderung eintrat. Deshalb soll auf die Einzelheiten dieser Versuche ebenfalls nicht näher eingegangen werden.

Über die Nährstoffansprüche der sieben Stammgruppen konnten deshalb trotz großer Versuchsreihen lange keine näheren Einzelheiten ermittelt werden. Dies schien schließlich damit zusammenzuhängen, daß der auch von uns lange als C-Quelle für unentbehrlich gehaltene Nährstoff, das Pepton, in seiner Zusammensetzung nicht hinreichend bekannt ist, vielleicht schon als Handelsware nicht immer die gleiche Beschaffenheit hat und in Lösung wechselnde Veränderungen bei der Sterilisation erleiden dürfte.

Der von *Gaffron* (1933, S. 8) besonders für Massenkulturen empfohlene Hefekochsaft mit einem Zusatz von dreibasischem Natriumcitrat, Kaliumbutyrat und $NaHCO_3$ hat sich für unsere *reinen* Stämme bestenfalls als gleichwertiges (*Rhodospirillum Nr. 1*), meist als ein weniger geeignetes Substrat erwiesen. Organische Säuren (Essigsäure, Buttersäure, Milchsäure, Citronensäure, Bernsteinsäure), als Natriumsalze angewendet, haben sich, mit Pepton gleichzeitig geboten, sowohl unter normalen als auch unter vermindertem Sauerstoffdruck als unbrauchbar oder als indifferent erwiesen. Diese Feststellungen legen neuerdings die Vermutung nahe, daß die Ergebnisse von Versuchen mit unreinen Zellgemischen durch die Mitwirkung der anderen Bakterien getrübt werden.

Es hat sich später gezeigt, daß das Problem der Kultur der *Athiorhodobakterien* nicht mit Hilfe einer bestimmten Nährstoffmischung gelöst werden kann. Das Rätsel klärte sich auf ganz andere Weise.

Phaeomonas Nr. 23 und *Chloropseudomonas Nr. 1* vermehren sich auf den für die übrigen Stämme geeigneten Nahrböden nicht oder nicht sicher. Brauchbar ist bisher nur ein Nährboden, der außer 1 bis 2% Agar noch 0,01% $(NH_4)_2SO_4$, 0,001% K_2HPO_4, 0,001% $MgSO_4$ und 0,0001% $FeCl_3$ enthält, also eine Zusammensetzung aufweist, die auch *Chromatium* eine gute Vermehrung erlaubt [*Czurda* (1936a)].

Lichtbedürfnis.

Mit den lange Zeit verwendeten Ausstrichagarkulturen und Lösungskulturen mit *Witte*- und *Vaillant*-Pepton wurde die Fähigkeit unserer Stämme zur Vermehrung unter Lichtausschluß bei normalem und vermindertem O_2-Druck geprüft. Im Gegensatz zu dem Verhalten des *Molisch*schen *Rhodobacillus* und *Rhodobacterium capsulatum* (1907,

S. 70) und der Stämme *van Niels* (1930, S. 167) erwies sich keiner der geprüften reinen Stämme (der Gruppe ***Rhodopseudomonas Nr. 1, 9, 16, Phaeomonas Nr. 14, 23*** und ***Rhodospirillum Nr. 1***) als dazu befähigt. Das gleiche gilt für die anderen hier nicht genannten Stämme. Auch in den unten (S. 112, 115) behandelten späteren Versuchen unter Außenbedingungen, deren vorzügliche Eignung für Vermehrung durch viele Versuche gesichert war, ergab sich eine schwache Vermehrung im Dunkeln, am deutlichsten bei ***Rhodospirillum Nr. 1*** und ***Rhodopseudomonas Nr. 16.***

Das Sauerstoffbedürfnis.

Obwohl wir schon, ähnlich wie *Schneider* (1930), gefunden hatten, daß bei ***Massenimpfungen*** auf die Substratfläche oder in Lösungen eine auf eine bestimmte Höhe verringerte O_2-Spannung bei Verwendung der Peptonnährböden am geeignetsten ist, und zwar bei:

Stammgruppe	*Rhodopseudomonas*	*Nr.*	*1*	rund	1 % O_2,
,,	,,	,,	*9*	,,	5,5 % O_2,
,,	,,	,,	*16*	,,	5,5 % O_2,
,,	*Phaeomonas*	,,	*14*	,,	5,5 % O_2,
,,	,,	,,	*23*	,,	21,0 % O_2,
,,	*Rhodospirillum*	,,	*1*	,,	5,5 % O_2,
,,	,, *rubrum Esmarch*			,,	5,5 % O_2,
,,	*Chloropseudomonas*	,,	*1*	,,	1,0 % O_2,

und daß völlige O_2-Freiheit, durch *Burri*-Verschluß (Pyrogallol-KOH-Lösung) hergestellt, eine Verschlechterung oder ein völliges Ausbleiben der Vermehrung besonders bei ***Rhodopseudomonas Nr. 1, 9*** und ***Phaeomonas Nr. 14*** gebracht hatte, wurde die Möglichkeit der Anaerobiose neuerdings versucht.

Versuchsreihe 2. Diesmal wurde bei sonst unverändertem Substrat (1 % Pepton, 2 % Agar) die Entfernung des O_2 mittels H_2S, den schon *van Niel* (1930, S. 168), *van Niel* und *Müller* (1931, S. 256ff.), *Gaffron* (1933, S. 8) verwendet und als unschädlich erkannt haben, unter Verwendung von Indigkarmin als Indikator für den Eintritt der Reduktion vorgenommen [Doppelschichtverfahren *Czurdas* (1936a, S. 111)].

Bei dieser Anordnung haben sich die ***einzeln*** eingesäten Keime der Stämme von ***Rhodopseudomonas Nr. 1, 9*** und ***16, Phaeomonas Nr. 14, Rhodospirillum Nr. 1, Chloropseudomonas Nr. 1,*** also bei völligem Fehlen von molekularem Sauerstoff und reduzierbaren Substanzen, in 6 bis 8 Tagen zu sichtbaren, tief pfirsichblütroten bzw. gelbbraunen und olivgrünen Kolonien entwickelt. Ausgeblieben war die Entwicklung von ***Phaeomonas Nr. 23*** und ***Rhodospirillum rubrum Esmarch, Stamm Wien*** und ***London.*** Nach diesen Befunden sind die geprüften ***Athiorhodobakterien***-Stämme (***Rhodopseudomonas Nr. 1, 9, 16, Phaeomonas Nr. 14,***

Rhodospirillum Nr. 1 und *Chloropseudomonas Nr. 1*) fakultativ strengst anaerob.

Die fortgesetzte Beobachtung der mit H_2S sauerstofffrei gemachten Doppelschichtkulturen ergab die von *van Niel* und *Müller* (1931, S. 254) bereits beobachtete Erscheinung, daß einige Zeit nach dem Sichtbarwerden der Kolonien in der Kulturschicht, die vor dem Eindringen von Luftsauerstoff durch die noch gelblich gefärbte Deckschicht geschützt war, ohne Eindringen von Luftsauerstoff ein Farbumschlag des Indigkarmins von Gelb nach Blau eintritt, daß also ein nach der positiven Seite verschobenes Redoxpotential auftritt. Eine Abscheidung von Schwefel innerhalb oder außerhalb wurde bei diesen Stämmen in diesem Nährboden trotz vieler Beobachtungen nie gesehen.

Werden eben gebläute, bis dahin dauernd belichtete Kulturen bei noch reduzierter Deckschicht verdunkelt, so tritt wiederum durch den in der Deckschicht noch vorrätigen H_2S Reduktion des Indikators ein. Wird hierauf eine solche Kultur neuerdings dem Lichte ausgesetzt, so erfolgt wiederum Bläuung der Kulturschicht. Der Farbwechsel läßt sich bei solchen Kulturen, die vom ersten Farbumschlag an den normalen Tag- und Nachtwechsel unterworfen werden, einige Male beobachten, und zwar so lange, bis kein H_2S mehr in der Deckschicht vorrätig ist. Dann wird auch diese Schicht bei Andauer der Belichtung gebläut. Nach diesem Zeitpunkt läßt sich durch Verdunklung die mit Kolonien dicht besäte Kulturschicht nicht mehr in so kurzer Zeit reduzieren, eine Erscheinung, die auch Kulturen von *Chromatium* zeigen[1].

Bei der Betrachtung solcher Kulturen fällt eine weitere Erscheinung auf. Die Kolonien mancher Stämme sind in den verschiedenen Höhen der Kulturschicht nicht gleich groß, sondern nach oben, der Deckschicht, also dem H_2S-Vorrat zu, größer. Sie verraten durch ihre zunehmende Größe eine Förderung, die auch bei Kolonien von *Chromatium* vorkommt. Die Förderung des Kolonienwachstums von der Deckschicht her zeigen besonders *Rhodopseudomonas Nr. 9, 16, Phaeomonas Nr. 14* und *Rhodospirillum Nr. 1*. Sie fehlt bei *Rhodopseudomonas Nr. 1*.

Es sind somit für *Rhodopseudomonas Nr. 1, 9, 16, Phaeomonas Nr. 14* und *Rhodospirillum Nr. 1* die gleichen Verhältnisse aufgefunden worden, die bei *Chromatium* durch H_2S-Verbrauch zustande kommen. Diese

[1] Der erste von uns (1936a) hat in der Umfärbung des zugesetzten Indikators den Beweis für die Entstehung von Sauerstoff im Assimilationsprozeß von *Chromatium* gesehen. Diese Auffassung wurde verlassen [siehe *van Niel* (1936)].

Beobachtungen decken sich nicht mit den Feststellungen von *van Niel* und *Müller*, denen zufolge *Athiorhodobakterien* H_2S nicht als H-Donator verwenden können.

Weitere Abänderungen der Kulturanordnung.

Im Hinblick auf die Feststellung der CO_2-Assimilation der *Athiorhodobakterien* durch *Gaffron* (1933) mußte vermutet werden, daß in manchen der früheren, anaerob gehaltenen Peptonkulturen ohne Vermehrungseintritt oder ohne Indikatorenumschlag die im Substrat vorhandene CO_2-Menge nicht ausreichend war. Es wurde daher geprüft, ob bei dieser Kulturweise mit einer Steigerung des CO_2-Gehaltes durch Zusatz von $NaHCO_3$ eine raschere und gleichmäßigere Entwicklung unter sonst gleichbleibenden, durch H_2S-Zusatz geschaffenen anaeroben Versuchsbedingungen möglich sein würde.

Versuchsreihe 3. Der gleiche *Vaillant*-Peptonnährboden wurde in weiteren Versuchen mit $NaHCO_3$ (0,25 %) versetzt und alles übrige der Versuchsanordnung beim alten belassen. Es zeigte sich nun tatsächlich wenigstens bei *Rhodopseudomonas Nr. 9* und *16*, *Phaeomonas Nr. 14*, *Rhodospirillum Nr. 1* nicht nur ein ausnahmsloses Angehen und eine weitgehende Verbesserung des Anwachsens, sondern auch der Entwicklung der Kolonien.

In wieweit die CO_2 in den Peptonnährboden für das Gedeihen notwendig ist, sollte folgende Versuchsreihe zeigen.

Versuchsreihe 4. 1 %ige *Vaillant*-Peptonlösung (p_H 5,2) wurde zu 5 ccm in Röhrchen (Kavalierglas, Böhmen) bei 100° C sterilisiert und mit Material aus aerob gehaltenen Agarkulturen beimpft. Zwei Doppelreihen dieser Kulturen wurden mit 0,25 % $NaHCO_3$ versetzt und bei Belassung der normalen O_2-Tension mit Gummistopfen und Gelatine verschlossen, um die erhöhte CO_2-Tension zu erhalten. Eine Doppelreihe wurde belichtet, die andere verdunkelt. Eine dritte Doppelreihe wurde bei Belassung der ursprünglichen O_2-Tension CO_2-frei gemacht. Das geschah nach der Art des *Burri*-Verschlusses, wobei als Absorptionslösung 0,5 ccm einer 40 %igen KOH zur Anwendung gelangte. Der Gummistopfen wurde ebenfalls mit Gelatinelösung gedichtet. Diese Reihe wurde belichtet. Zwei weitere Doppelreihen wurden mit dem *Burri*-Verschluß für anaerobe Kulturen versehen, d. h. die vorige Versuchsanordnung durch Hinzufügen von 0,5 ccm 44 %iger Pyrogallollösung ergänzt. Dadurch ist für die Entfernung nicht nur der CO_2, sondern auch des O_2 gesorgt worden. Durch Zusatz von Indigkarmin zur Peptonlösung wurde der Verlauf der O_2-Entfernung sichtbar gemacht. Eine Doppelreihe wurde belichtet, die andere verdunkelt. Alle Kulturen eines Organismus sind am gleichen Tage vom gleichen Ausgangsgemisch beimpft worden.

Nach Ablauf von 3 Tagen war in den Röhrchen der ersten Doppelreihe bei allen Organismen eine sehr starke rosarote Trübung und reichlicher karminroter Bodensatz gebildet, während in den CO_2- sowie in den O_2- und CO_2-freien Licht- und Dunkelkulturen die Lösungen völlig klar waren. Die Versuchskulturen wurden weiterhin beobachtet, um eine durch Unterbindung der CO_2-Assimilation vielleicht bedingte langsame Entwicklung nicht zu übersehen. Eine verspätete Entwicklung, die aber auch zu großen Ernteerträgen geführt hat, ist nur in den O_2-haltigen, aber CO_2-freien Lichtkulturen von *Rhodopseudomonas Nr. 16* und *Rhodospirillum Nr. 1* vor sich gegangen.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe nach 10tägiger Dauer ist in der folgenden Tabelle 1 zusammengestellt. Zum Vergleich mit dem Ergebnis der Doppelschichtkulturen, die unter völliger O_2-Freiheit, aber bei hinreichender CO_2-Versorgung standen, ist dieses mit in die Tabelle aufgenommen. Ebenso sind die zu einer anderen Zeit angestellten Versuche mit *Rhodospirillum rubrum Esmarch, Stamm Wien*, aufgenommen.

Tabelle I.

Vaillant-Pepton, 1 %ige Lösung p_H 5,2	Lösungskultur Normale O_2-Tension			Lösungskultur O_2-frei (*Burri*verschluß)		Agarkultur O_2-frei mit n/5000 H_2S	
	Licht		dunkel	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel
	CO_2 gesteigert 0,25 % $NaHCO_3$	CO_2-frei	CO_2 gesteigert 0,25 % $NaHCO_3$	O_2-frei		CO_2 gesteigert 0,25 % $NaHCO_3$	
Rhodobacterium Nr. 1	+++ p_H 7,8	0 p_H 5,4	0 p_H 7,1	0 p_H 5,4	0	+++	0
Rhodobacterium Nr. 9	+++ p_H 8,0	0 p_H 5,6	0 p_H 7,2	0 p_H 5,3	0	+++	0
Rhodobacterium Nr. 16	+++ p_H 7,8	+++ p_H 7,9	0 p_H 7,3	0 p_H 5,4	0	+++	0
Rhodobacterium Nr. 14	+++ p_H 8,0	0 p_H 5,3	0 p_H 7,1	0 p_H 5,3	0	+++	0
Rhodospirillum Nr. 1	+++ p_H 8,2	+++ p_H 8,1	0 p_H 7,5	0 p_H 5,3	0	+++	0
Rhodospirillum rubrum Stamm Wien	0 p_H 7,6	0 p_H 5,3	0 p_H 7,3	0 p_H 5,2	0	0	0
Chloro-pseudomonas Nr. 1	0	0	0	0	0	0	0

+++ = starkes Wachstum, voluminöser Bodensatz; + = leichte Trübung der Lösung; 0 = keine Vermehrung, klare Lösung.

Aus diesen Befunden kann bezüglich der C-Versorgung folgendes abgeleitet werden.

Die *Rhodopseudomonas*-Stämme *Nr. 1, 9* und *Phaeomonas Nr. 14* sind auf *Vaillant*-Peptonnährböden obligat C-autotroph, und zwar sowohl unter aeroben wie anaeroben Verhältnissen. Denn der für die Vermehrung vorzüglichst geeignete Stoff, das Pepton, erlaubt eine solche *nur* bei Stattfinden der CO_2-Assimilation, also im Lichte, und da wiederum nur, wenn CO_2 vorhanden ist. Es ist auch durch unsere Beobachtungen gezeigt, daß die genannten Organismen die CO_2 und keineswegs das Pepton als Kohlenstoffquelle ausnutzen.

Es ist daher fraglich, ob es zweckmäßig ist, zur Bezeichnung des Stoffwechsels der *Athiorhodobakterien* den Ausdruck Heterotrophie (*van Niel*, *Müller*, *Gaffron*) weiterhin zu verwenden, mit dem nicht ersichtlich gemacht ist, ob er sich auf den Bau- oder Energiestoffwechsel bezieht. Da heute die Beibehaltung klarer Begriffe von Auto- und Heterotrophie eine Fundierung auf den Baustoffwechsel verlangt, und da es üblich und notwendig geworden ist, eine Unterscheidung von autotroph und heterotroph bei jedem einzelnen Nährelement zu machen, erscheint es vorteilhaft, die hier vorliegenden Organismen als C-autotroph zu bezeichnen.

Die Stammgruppe *Rhodopseudomonas Nr. 16* und *Rhodospirillum Nr. 1* sind auf Peptonnährboden (*Vaillant* und *Witte*) unter anaeroben Bedingungen ebenso C-autotroph. Unter aeroben Bedingungen und im Lichte vermögen sie jedoch den C-Bedarf auch aus dem Pepton (bei CO_2-Ausschluß) fast mit dem gleichen Erfolg zu decken. Die beiden ernähren sich demnach unter aeroben Verhältnissen bei CO_2-Ausschluß C-heterotroph. Wir mussen demnach die beiden als C-mixotrophe Organismen ansprechen.

Das Verhalten der beiden Stamme erinnert an die Beobachtungen von *van Niel* und *Müller* (1931, S. 261), die an ihren Stämmen ein Wachstum unter anaeroben Bedingungen nur im Lichte, ein Wachstum im Dunkeln nur unter aeroben Bedingungen feststellen konnten. Die Vermehrung unserer beiden Organismen im Dunkeln bei O_2-Gegenwart ist allerdings so gering, daß es uns fraglich erscheint, ob ihr in diesem Zusammenhang eine entsprechende Bedeutung beigemessen werden kann wie den CO_2-freien aeroben Lichtkulturen. Trotz mehrfacher Wiederholung konnten wir ihrer nicht ganz sicher werden. Die Verschiedenheit zwischen den *van Niel-Müller*schen und unseren Ergebnissen scheint auf der Verschiedenheit der untersuchten Organismen zu beruhen.

Das in der Tabelle mit aufgenommene ***Rhodospirillum rubrum Esmarch***, ***Stamm Wien***, hat sich in gleichartig eingerichteten Versuchsreihen vom *Rhodospirillum Nr. 1* abweichend verhalten. Es vermehrt sich zwar unter den eingerichteten Kulturbedingungen (21 bis 1 % O_2, 1 % *Vaillant*-Pepton, *Witte*-Pepton, Hefekochsaft nach *Gaffron*) im

Lichte, aber trotz wiederholter kurzer Passagen nur schwach, bei schwacher Ausbildung des Farbstoffes. Erst in der letzten Zeit zeigt dieser sowie der Londoner Stamm ein rascheres Wachstum unter Ausbildung des karminroten Farbstoffes, wie *Rhodospirillum Nr. 1*. Das scheint die längere Kultur in H_2-Atmosphäre mit sich gebracht zu haben. Die auf gleichem Substrat in gewöhnlicher Luft gehaltenen Kulturen sind unverändert blaß geblieben.

Die Messung der Reaktionsänderung ergab in allen Fällen einen Anstieg, niemals einen Abfall des p_H-Wertes. Das wurde nach den Beobachtungen von *Schneider* (1930, S. 93), der an *Rhodobacillus palustris* in Glycerin-Pepton-Stichkulturen, nicht aber in Lösungskulturen Säuerung gesehen hat, erwartet. Auch sonst haben wir Säuerung nicht angetroffen[1].

Versuchsreihe 5. Die gleiche Versuchsgruppe wurde auch mit einer *Witte*-Pepton-Fleischextraktlösung (1% *Witte*-Pepton, 0,5% *Liebigs* Fleischextrakt) mit einer Anfangsreaktion von p_H 6,0 bis 6,2 wiederholt. Die in Tabelle II wiedergegebenen Ergebnisse deckten sich mit denen der vorigen Reihe. Während also *Rhodospirillum Nr. 1* und *Rhodopseudomonas Nr. 16* auch in den belichteten CO_2-freien Röhrchen den gleichen voluminösen karminroten Bodensatz nach 8 Tagen zeigten, wie die CO_2-haltigen belichteten Parallelversuche, waren die entsprechenden CO_2-freien Röhrchen mit *Rhodopseudomonas Nr. 1, 9* und *Phaeomonas Nr. 14* völlig klar geblieben. Die verdunkelten, entsprechenden Reihen zeigten aber im Gegensatz zur vorhergehenden Versuchsreihe eine mehr oder minder deutliche Trübung der Lösung ohne Bodensatz. Bei *Rhodospirillum Nr. 1* und *Rhodopseudomonas Nr. 16* war eine Vermehrung am deutlichsten erkennbar. Wenngleich dies an die Beobachtungen von *Molisch*, *van Niel* und *Müller* erinnert, die unter aeroben Bedingungen im Lichte und Dunkeln eine gleiche Vermehrung gefunden haben, so ist doch in unseren Versuchen der Unterschied so auffallend groß und gleichbleibend, daß auch bei den letztgenannten beiden Organismen von einer Wirkungslosigkeit des Lichtes nicht die Rede sein kann.

Die in dieser Versuchsreihe mitverwendeten *Rhodospirillum rubrum*-Stämme, und zwar der Wiener (*Esmarch*sche) und der Londoner Stamm, zeigen in allen aerob gehaltenen CO_2-haltigen wie CO_2-freien Kulturen die gleiche schwache Vermehrung, welche nur zu einer weißlichen Trübung der Lösung ohne Bodensatzbildung führt. Auch auf festen Nährböden werden nur langsam wachsende weißliche, höchstens

[1] Nach mündlicher Mitteilung von *van Niel* haben die in den vermeintlichen Reinkulturen von *Schneider* aufgefundenen Milchsäurebakterien die Säuerung herbeigeführt.

Tabelle II.

1 % *Witte*-Pepton mit 0,5 % Fleischextrakt p_H 6,1	Normale Sauerstofftension			
	Licht		Dunkel	
	CO_2 gesteigert 0,25 % $NaHCO_3$	Ohne CO_2	CO_2 gesteigert 0,25 % $NaHCO_3$	Ohne CO_2
Rhodopseudomonas Nr. 1	+++ p_H 8,2	0 p_H 6,1	+ (?) p_H 6,9	+ (?) p_H 6,2
" " *9*	+++ p_H 8,2	0 p_H 6,0	+ (?) p_H 6,9	+ (?) p_H 6,3
" " *16*	+++ p_H 8,0	+++ p_H 8,1	+ p_H 7,1	+ p_H 6,1
Phaeomonas Nr. 14	+++ p_H 8,0	0 p_H 6,1	+ (?) p_H 7,1	+ (?) p_H 6,1
" " *23*	0 p_H 6,8	0 p_H 6,1	0 p_H 7,1	0 p_H 6,2
Rhodospirillum Nr. 1	+++ p_H 8,2	+++ p_H 8,2	+ p_H 6,9	+ p_H 6,6
Rhodospirillum rubrum Stamm Wien	+ p_H 7,9	+ p_H 6,1	+ p_H 6,9	+ p_H 6,1
" " " *London*	+ p_H 7,2	+ p_H 6,2	+ p_H 7,2	+ p_H 6,1
Chloropseudomonas Nr. 1	0	0	0	0

Zeichen wie in Tabelle I.

undeutlich rosa gefärbte Kolonien erhalten. In ihnen liegen also von der CO_2-Assimilation vollkommen unabhängige Organismen vor. Die beiden Stämme unterscheiden sich auch dadurch von *Rhodospirillum Nr. 1*, daß sie unter den durch *Burri*-Verschluß oder durch H_2S- oder Na_2S-Zusatz geschaffenen anaeroben Bedingungen bisher nicht zur Vermehrung gebracht werden konnten.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde bei keinem der Organismen eine Reaktionsverschiebung nach der sauren, sondern, auch in der Lösung ohne $NaHCO_3$-Zusatz, nach der alkalischen Seite festgestellt.

Obligat C-heterotrophe *Athiorhodobakterien*, also Organismen, die bereits einer anderen Bakteriengruppe zuzuzählen wären, oder solche, welche sich auf Peptonnährböden ebenso gut im Dunkeln vermehren, also Stämme, wie sie *Molisch* (1907, S. 70 unter *Rhodobacillus palustris*, *Rhodobacterium capsulatum*), *van Niel* (1930, S. 167), *Gaffron* (1933, S. 3) vorlagen, haben wir außer den beiden übernommenen Stämmen von *Rhodospirillum rubrum* bis jetzt nicht gefunden.

Versuchsreihe 6. Auch der Ausschluß des Peptons unter Beibehaltung der anaeroben Bedingungen (das obige Doppelschicht-

verfahren mit H_2S) konnte eine weitere Klärung der Assimilationsfrage bringen. Es wurde zunächst ein Mineralsalzagar von nachstehender Zusammensetzung, wie für die Kultur von *Chromatium*, verwendet: $(NH_4)_2SO_4$ 0,01 %, K_2HPO_4 0,001 %, $MgCl_2$ 0,001 %, $FeSO_4$ 0,0001 %, $NaHCO_3$ 0,25 %. An Stelle des Peptons trat als alleinige C-Quelle CO_2 und als N-Quelle Ammoniumsulfat. Mit diesem Nährboden wurden Doppelschichtkulturen mit Indigkarmin vorbereitet und mit H_2S in üblicher Weise (0,0005 bis 0,001 n H_2S oder 0,012 % Na_2S) versetzt. Von allen Organismen, mit Ausnahme von *Phaeomonas Nr. 23*, hat sich ein Teil der eingesäten Zellen langsam zu großen Kolonien entwickelt. Am besten und immer verläßlich vermehrt sich darin *Rhodospirillum Nr. 1*. Diese C- und N-Ernährung reicht für eine, wenn auch geschwächte, Vermehrung aus. Natürlich können die im Agar noch vorhandenen organisch gebundenen N-Mengen mitgewirkt haben. Auch in diesen Kulturen ist weder vor noch nach dem Indikatorenumschlag, weder innerhalb noch außerhalb der Kolonie abgeschiedener Schwefel gefunden worden.

Versuchsreihe 7. Es wurde daher die gleiche Mineralsalzlösung (p_H 7,2) ohne Agarzusatz unter normaler O_2- und durch Zusatz von 0,25 % $NaHCO_3$ unter gesteigerter CO_2-Tension bei gasdichtem Gummiverschluß und Belichtung auf die Eignung geprüft, ob sie zur Vermehrung ausreicht. Es ist eine sehr schwache, eben noch merkliche Vermehrung erfolgt, welche anscheinend nur auf Kosten der Reservestoffe in den Zellen vor sich gegangen ist. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Peptonversuche zeigt auch diese Reihe das beste Fortkommen bei *Phaeomonas Nr. 14* und vor allem *Phaeomonas Nr. 23*, dieses jedoch nur dann, wenn H_2S oder Na_2S so zugesetzt werden, daß die Indikatorenumfärbung eben beginnt.

Durch Vergleich der Ergebnisse der Versuchsreihen 3, 4 und 5 ergibt sich auch auf diesem Wege, daß das für die Vermehrung der meisten *Athiorhodobakterien* so wichtige Pepton nicht als C-Quelle, wie man früher meinen konnte, sondern entweder als ein durch den Gehalt an Wasserstoffdonatoren ausgezeichnetes Substrat (*van Niel* und *Müller*) oder als N- oder S-Quelle die auffallende Vermehrungsförderung hervorrufen dürfte. In dieser Richtung werden die Stoffwechseluntersuchungen fortgesetzt.

Die bisherigen Beobachtungen haben somit ergeben, daß die Gruppe der *Athiorhodobakterien* keineswegs physiologisch einheitlich ist, wie es nach den bisherigen Darstellungen den Anschein haben mußte.

Ein auffallendes und von den übrigen abweichendes Verhalten zeigt unter den aufgezählten Organismen *Phaeomonas Nr. 23*. Dieser Organismus wird als einer der zähesten Begleiter des *Chromatium* immer wieder in dessen Anreicherungskulturen angetroffen. Auffallend war

an ihm, daß er in allen Kulturen, die zur Isolierung von *Chromatium* angelegt worden sind, erst dann sichtbar zur Entwicklung gelangt, wenn der H_2S völlig verbraucht und das Indigkarmin wieder gebläut war. Wie Reinkulturen gezeigt haben, gedeiht er sehr gut auf dem gleichen Mineralsalzsubstrat wie *Chromatium*, hier jedoch wiederum nur dann, wenn sich im Substrat Sauerstoff vorfindet. In den aerob gehaltenen Agarschichten bildet es rötlichgraue Kolonien. Seine Entwicklung unterbleibt in der Reinkultur, wenn durch H_2S Sauerstofffreiheit eingerichtet worden ist.

Versuchsreihe 8. Wird er aber den anaeroben Doppelschichtkulturen von *Chromatium* gleichzeitig zugesetzt, oder wird er in einer unter der *Chromatium*-Kulturschicht unterlagerten zweiten Kulturschicht, getrennt also von *Chromatium*, eingesät („Dreischichtkultur"), so erscheinen, wie in den Kulturen zwecks Isolierung, seine nun grünlichgelb gefärbten Kolonien 4 bis 7 Tage nach dem Farbumschlag des Indikators. Dabei ist eine deutliche Wachstumsförderung der *Phaeomonas*-Kolonien durch solche von *Chromatium* zu bemerken. Ebenso ist eine Förderung von *Chromatium* durch *Phaeomonas* deutlich ausgeprägt. Sind in der *Phaeomonas*-Kulturschicht viele Kolonien angewachsen, so bleiben sie noch wochenlang grünlichgelb gefärbt. Sind nur vereinzelte Kolonien angegangen, so schlägt die gleiche Anfangsfarbe nach Tagen ins Rötliche um, so daß die Kolonien schließlich so gefärbt sind wie die bei O_2-Gegenwart gewachsenen.

Phaeomonas Nr. 23 schreitet in gleichzeitig und gleichartig beimpften, dem Luftsauerstoff aber zugänglich gehaltenen Hochschichtschüttelkulturen (mit dem gleichen Zusatz von H_2S, 0,001 n Lösung) nur in einer Zone zwischen dem 5. und etwa 15. mm, vom Meniskus aus gemessen, zur Entwicklung sichtbarer, rötlich gefärbter, nach der Tiefe an Größe und Rötung abnehmender Kolonien. Der erstgenannte von uns hat das Erscheinen und die Umfarbung der Kolonien und die ihm stets vorangehende Bläuung des Indikators einer Sauerstoffabscheidung des *Chromatium* zugeschrieben (1936 b). Diese Auffassung wurde jedoch im Hinblick auf die Mehrdeutigkeit dieses Versuches verlassen.

Die bisher unterscheidbaren Organismen.

Hier sei in kürzester Form eine Beschreibung der bisher deutlich unterscheidbaren Stammgruppen gegeben, soweit sie nach der bisherigen Untersuchung gesichert erscheint. Eine größere Reihe von dem *Rhodopseudomonas Nr. 1, 9* und *16* nahestehenden Stämmen sind infolge der Gestaltsmannigfaltigkeit, wahrscheinlich durch Degenerations- und Involutionsformen hervorgerufen, nicht nur schwer in ihrer charakteristischen Grundgestalt zu erkennen, sondern auch wegen des wechselnden Verhaltens in der Kultur schwer bestimmten Stämmen zuzuordnen.

Wir sind deshalb zur Zeit noch nicht imstande, alle von den verschiedenen natürlichen Standorten mit verschiedenen Anreicherungs- und Isolierungsmethoden herausgezüchteten Organismen auf systematische Verwandtschaft zu prüfen.

Von *Athiorhodobakterien* sind bisher nachstehende Vertreter beschrieben und untersucht worden:

Rhodobacterium capsulatum	*Molisch* (1907) in Reinkultur (einzige Meerwasserform von den hier genannten).
Rhodobacillus palustris	*Molisch* (1907) in Reinkultur.
	Schneider (1930) in Reinkultur [1].
	van Niel und *Müller* (1931) in Reinkultur.
	Gaffron (1933) in Anreicherungskultur.
Rhodococcus capsulatus	*Molisch* (1907) in Anreicherungskultur.
Rhodococcus minor	*Molisch* (1907) in Anreicherungskultur.
Rhodocystis gelatinosa	*Molisch* (1907) in Anreicherungskultur.
Rhodonostoc capsulatus	*Molisch* (1907) in Anreicherungskultur.
Spirillum rubrum	*Esmarch* (1887) in Reinkultur.
	Migula (1900) in Reinkultur.
	Lehmann und *Neumann* (1907, S. 496) in Reinkultur.
	Vahle (1910, S. 238) in Reinkultur.
	van Niel und *Müller* (1931) in Reinkultur.
	van Niel und *Smith* (1935) in Reinkultur.
Rhodovibrio parvus	*Molisch* (1907) in Anreicherungskultur.
Rhodospirillum photometricum	*Molisch* (1907) in Reinkultur.
Rhodospirillum giganteum	*Molisch* (1907) in Anreicherungskultur.
	Schrammeck (1934) in Reinkultur.
Rhodospirillum gracile	*Hama* (1933) in Anreicherungskultur.
Rhodospirillum longum	*Hama* (1933) in Anreicherungskultur.
Streptococcus varians	*Ewart* (1897) in Reinkultur.
	van Niel und *Müller* (1931) in Reinkultur.

Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, daß viele der aufgestellten Arten nur nach dem Verhalten in der Anreicherungskultur beschrieben worden sind. Wie bekannt ist, sind die morphologischen Beschreibungen selbst der reinkultivierten Arten bei den *Eubacteria* meist nicht ausreichend, um eine Art wieder zu erkennen. Wir mußten uns daher auf den Vergleich der von uns aus verschiedenen Materialien angereicherten und reingezüchteten Formen mit den Beschreibungen der Literatur beschränken. Eine wirkliche Bestimmung war nicht möglich.

Im folgenden sei eine kurze Beschreibung der von uns aufgefundenen sieben gefärbten, schwefelfreien Organismen der *Athiorhodobakterien*-Gesellschaften zusammen mit den übernommenen Stämmen von *Rhodospirillum rubrum* gegeben. Der Erläuterung dieser Angaben sei folgendes vorangestellt.

---

[1] Siehe Anmerkung auf S. 114.

Der Angabe über Vermehrungsfähigkeit sind, wo nichts anderes vermerkt ist, nur Kulturen zugrunde gelegt, in denen eine Kolonienentwicklung aus *einzeln* eingesäten Keimen (Schüttelkulturen) stattgefunden hat. Kulturen mit Massenaussaaten (Ausstriche) bringen keine klaren Ergebnisse. Auch auf unbrauchbaren Substraten kann eine Vermehrung durch Kolonienwachstum auf Kosten von Reservestoffen vorgetäuscht sein.

Die Zellform wurde im Zustande reger Zellvermehrung festgelegt. Je nach der Güte des Substrats bleibt die Vermehrung verschieden lange erhalten. Die Form ist in verschiedenen Substraten in den Anfangsphasen der Passage aufzufinden.

Als Form der Tiefenkolonie ist jene festgehalten, welche in 1- bis 2%igem Agar ausgebildet wird.

Der Angabe über *Gram*-Verhalten ist folgender Färbevorgang zugrunde gelegt: Karbolgentiana 2 Minuten, *Lugol* sche Lösung 30 Sekunden, 92%iger Alkohol bis zum Verschwinden der Farbwolken, wässerige Fuchsinlösung 5 Minuten.

Die Beschaffenheit der Oberflächenkolonien ist nach Kulturen in Wasserstoffatmosphäre beschrieben. Die Luft des Kulturraumes ist auf 80 mm Hg-Druck entfernt und mit Wasserstoff auf 600 mm ergänzt. Durch Unterbringung einer $NaHCO_3$-Lösung ist für CO_2-Nachschub gesorgt.

Gattung *Rhodopseudomonas Kluyver* und *van Niel* 1936[1].

Rhodopseudomonas Nr. 1.

Vermehrung. Gut in *Vaillant-* und *Witte*-Pepton unter aeroben und anaeroben Bedingungen, jedoch nur bei Belichtung und bei Gegenwart von CO_2. In beiden Vermehrung auch bei H_2S-Gegenwart. In Mineralsalzlösungen nur bei Anwesenheit von H_2S. In Peptonnährböden CO_2-Assimilation obligat. Wahrscheinlich C-autotroph. Ein Verbrauch des H_2S wahrscheinlich, aber bisher nicht gesehen. Dabei S-Fällung weder inner- noch außerhalb der Zellen.

Zellbeschaffenheit. Stäbchen von $0{,}3 \times 1$ bis $2\ \mu$ mit Eigenbewegung. Die Zellen bilden meist Zoogloea, dabei sind sie meist dicker und länger und haben einen ungleich dichten und ungleich färbbaren Inhalt, der oft an einem Zellende angesammelt zu sein pflegt. Einzelzelle farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien sind unter aeroben wie anaeroben Bedingungen scharf begrenzt, linsenförmig, dunkelkarminrot. Oberflächenkolonien in Wasserstoffatmosphäre kreisrund, erhaben, ganzrandig, wässerig glänzend, karminrot.

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Vorkommen. Anreicherungskulturen mit faulenden Rinderknochen von Faulschlamm des Waldteiches in Kuchelbad bei Prag, zwischen *Phaeomonas Nr. 14* und *Rhodospirillum Nr. 1.*

[1] Da der Name *Rhodomonas* in der Algologie bereits für eine *Cryptomonaden*-Gattung vergeben war (*Karsten*, 1897, Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen), schlägt Prof. *Kluyver* nach brieflicher Mitteilung eine Umbenennung der von ihm und *van Niel* (1936) noch übernommenen *Orla-Jensen*schen Gattungsbezeichnung in *Rhodopseudomonas* vor.

Rhodopseudomonas* Nr. 9** [= ? ***Rhodobacillus palustris Molisch (1907), ***Schneider*** (1930), = ? ***Rhodovibrio parvus Molisch*** (1907)].

Vermehrung. Sehr gut in *Vaillant-* und *Witte*-Pepton unter aeroben und anaeroben Bedingungen, jedoch nur bei Belichtung und bei Gegenwart von CO_2. In beiden auch Vermehrung bei H_2S-Gegenwart. In Mineralsalzlösungen nur bei Anwesenheit von H_2S. In Peptonnährböden CO_2-Assimilation obligat. Wahrscheinlich C-autotroph. In Pepton- und Mineralsalzlösungen wird H_2S verbraucht. Dabei keine S-Fällung, weder innerhalb noch außerhalb der Zellen.

Zellbeschaffenheit. Stäbchen von rund $0,3 \times 1$ bis 2 μ mit Eigenbewegung. In älteren Stadien der Kultur schwillt das eine Ende meist an, die Zellen sind dabei meist leicht gekrümmt, das angeschwollene Zellende stark färbbar. Einzelzellen erscheinen farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien sind unter aeroben und anaeroben Bedingungen scharf begrenzt, linsenförmig, dunkelkarminrot. Oberflächenkolonien in Wasserstoffatmosphäre kreisrund, erhaben, ganzrandig, wässerig glänzend.

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Gram-positive *Athiorhodobakterien* oder *Gram*-positive Inhaltsstoffe wie sie *Schneider* (1930, S. 91) vorlagen, haben wir noch nicht angetroffen.

Vorkommen. Anreicherungskulturen in Lösungen mit 0,1 % $(NH_4)_2SO_4$ und 0,25 % $CaHPO_4$ von Faulschlamm aus dem Teichabfluß von Jewan bei Prag.

Dieser Organismus ist von *Rhodopseudomonas Nr. 1* dadurch verschieden, daß er viel sicherer und rascher auf den gleichartigen Nährböden unter gleichen Versuchsbedingungen anwächst und regelmäßig viel größere Ernteerträge liefert als jener. Auch bildet er nicht so früh Involutionsformen wie *Rhodopseudomonas Nr. 1.* Daher ist eine Unterscheidung angezeigt.

Rhodopseudomonas* Nr. 16.** [= ? ***Rhodobacillus palustris Molisch (1907)].

Vermehrung. Sehr gut in *Vaillant-* und *Witte*-Pepton unter aeroben und anaeroben Bedingungen, jedoch nur bei Belichtung. Gegenwart von CO_2 ist bei Darbietung von Peptonlösungen nicht notwendig. In beiden Vermehrung auch bei H_2S-Gegenwart. In Mineralsalzlösungen Vermehrung nur bei Gegenwart von H_2S. In Peptonnährböden CO_2-Assimilation nicht obligat. Wahrscheinlich C-mixotroph. Ein Verbrauch von H_2S bisher nicht gesehen. S-Fällung weder inner- noch außerhalb der Zellen.

Zellbeschaffenheit. Stäbchen von rund $0,4 \times 1,0$ bis 1,5 μ mit Eigenbewegung. In älteren Kulturen wird diese Größenordnung und Beweglichkeit beibehalten. Die Zellen schwellen an dem einen Ende leicht an und führen hier einen dichteren Inhalt. Dieses Ende ist auch stärker färbbar. Einzelzellen erscheinen farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien sind unter aeroben und anaeroben Bedingungen scharf begrenzt, linsenförmig, dunkelkarminrot. Oberflächenkolonien in Wasserstoffatmosphäre kreisrund, erhaben, ganzrandig, wässerig glänzend, karminrot.

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Vorkommen. Aus Rohkulturen und Mineralsalzlösungen, welche mit NaHS bis zur Sauerstofffreiheit versetzt waren, nach einigen gleichen vorhergehenden Passagen. Aus dem Material von Koll. *Gaffron*, Berlin.

Der morphologisch und durch das lange Beibehalten der Größenordnung und Schwärmfähigkeit den *Rhodopseudomonas Nr. 1* und *Nr. 9* recht ähnliche Organismus unterscheidet sich von ihnen durch Unabhängigkeit seiner Vermehrung von der CO_2-Assimilation. In den ökologischen Ansprüchen deckt er sich weitgehend mit *Rhodospirillum Nr. 1*.

Gattung *Phaeomonas Kluyver* und *van Niel* 1936.

Phaeomonas Nr. 14. [= *Rhodonostoc capsulatus Molisch* (1907), *Rhodococcus capsulatus Molisch* (1907), = *Streptococcus varians Ewart* (1897), *van Niel* und *Müller* (1931, S. 260)].

Vermehrung. Sehr gut in *Witte*-Pepton und *Witte*-Pepton-Fleischextraktlösungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen, jedoch nur bei Belichtung und bei Gegenwart von CO_2. In beiden auch bei H_2S-Gegenwart. In Mineralsalzlösungen Vermehrung nur bei Anwesenheit von H_2S (braungrüne Kolonienfarbe!). In Peptonnährböden CO_2-Assimilation obligat. H_2S-Verbrauch wahrscheinlich (Förderung des Kolonienwachstums), aber bisher nicht gesehen. Dabei S-Fällung weder inner- noch außerhalb der Zellen.

Zellbeschaffenheit. Kurze kokkenartige Stäbchen von rund $0{,}5 \times 0{,}5$ bis $1{,}0\ \mu$ mit der meist nur vorübergehend sichtbaren Fähigkeit zur Eigenbewegung. Die Zellen sind meist unbeweglich in dicker Gallerthülle eingeschlossen. Einzelzellen farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien sind unter anaeroben Bedingungen scharf begrenzt, linsenförmig, braun [„Braunbakterien", *Gaffron* (1935)]. Unter aeroben Bedingungen braunrot bis karminrot je nach dem Alter und der Lage in der Substratschicht. In H_2S-haltigen Kulturen grünlichbraun. Oberflächenkolonien in Wasserstoffatmosphäre kreisrund, erhaben, ganzrandig, wässerig glänzend, braun, später karminrot.

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Vorkommen. Anreicherungskultur mit faulenden Rinderknochen von Faulschlamm des Waldteiches von Kuchelbad bei Prag. Anreicherungskultur von *Athiorhodobakterien*-Material einer Kultur von Dr. *Gaffron*, Berlin, in *Vaillant*-Peptonlösung.

Phaeomonas Nr. 23.

Vermehrung. Gut in Mineralsalzlösungen unter aeroben Bedingungen bei Belichtung und bei Gegenwart von CO_2. Keine Vermehrung in Peptonlösungen. Hierauf nur nach Massenimpfung auf die Substratoberfläche (Wasserstoffatmosphäre). H_2S erlaubt in keinem der beiden Falle sichtbare Vermehrung. CO_2-Assimilation obligat.

Zellbeschaffenheit. Kurze kokkenartige Stäbchen von rund $1{,}0 \times 1{,}0$ bis $1{,}5\ \mu$ mit der nur vorübergehend sichtbaren Fähigkeit zur Eigenbewegung. Meist sind die Zellen unbeweglich in dicker Gallerthülle eingeschlossen. Einzelzelle farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien aerob gehaltener Kulturen flach linsenförmig, rötlichgrau. Unter den von *Chromatium* durch H_2S-Verbrauch geschaffenen Bedingungen linsenförmige, gelblichgrüne Kolonien. Oberflächenkolonien (Mineralsalzagar) unter aeroben Bedingungen flach erhaben, kreisrund, ganzrandig, wässerig glänzend, rötlichweiß.

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Vorkommen. Anreicherungskulturen von *Chromatium* in Mineralsalzlösungen aus Schlamm aus einem Waldtümpel bei Raase in Schlesien, aus *Lamprocystis*-Biocoenose des Schloßteiches in Lunz, Österreich.

Die dem Stamm *Phaeomonas Nr. 14* ähnliche Zellform und die gleiche unter ähnlichen Bedingungen vor sich gehende Verfärbung legt die Vermutung nahe, daß es sich um den gleichen Organismus handelt. Da in vielen vergleichenden Versuchen mit verschiedenen Substraten mit mehreren vorangehenden Passagen zwecks Anpassung die Unterschiede erhalten geblieben sind, ist eine Unterscheidung angezeigt.

Gattung *Rhodospirillum Molisch* 1907.

Rhodospirillum rubrum Esmarch [*Spirillum rubrum Esmarch* (1887), *Migula* (1900), *Vahle* (1910), *Müller* (1931)].

Die folgende Beschreibung auf Grund eigener Untersuchungen eines Stammes aus der Sammlung Prof. *Přibram*, Wien, und eines Stammes aus der National Collection of Type Cultures, London, der in Nordamerika isoliert worden ist.

Vermehrung. In *Witte*-Pepton und *Witte*-Pepton-Fleischextraktlösungen unter aeroben Bedingungen im Licht und im Dunkeln gleich langsam mit schwacher Ausbildung des roten Farbstoffes. CO_2-Mangel läßt keinen deutlichen Einfluß erkennen. Erst nach längerer Kultur in Wasserstoffatmosphäre ist eine den übrigen Vertretern gleichkommende Farbstoffbildung und Vermehrungsweise eingetreten. Unter anaeroben Bedingungen (*Burri*-verschluß und H_2S-Gegenwart) ist bisher keine Vermehrung von *einzeln* ausgesäten Zellen beobachtet worden.

Zellbeschaffenheit. Bisher wahrscheinlich nur degenerierte Zellen gesehen, was auch bei den älteren Untersuchern der Fall gewesen sein dürfte. Zellen mit sehr steilen Windungen oder fast gerade, von rund 0,3 μ Dicke und 6 bis 20 μ Länge. Eigenbewegung mittels polaren Geißelschopfes. Einzelzelle farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien linsenformig nach der Tiefe zu von chamoisrosa bis karminrot gefarbt. Oberflächenkolonien in gewohnlicher Luft rundlich, mit unregelmaßig welligem Rand, erhaben, mit konzentrischen Wulstbildungen und radiär verlaufenden flachen Furchen, glanzend, chamoisfarbig mit Rosaschimmer. Bloß die Zellmassen des Quetschwassers karminrot gefärbt. Oberflachenkolonien in Wasserstoffatmosphäre sind nach mehreren Passagen so karminrot, wie die von *Rhodospirillum Nr. 1.*

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Rhodospirillum Nr. 1 [= *Rhodospirillum photometricum Molisch* (1907), *Rhodospirillum giganteum Molisch* (1907), *Schrammeck* (1934)].

Vermehrung. Sehr stark in *Vaillant*- und *Witte*-Peptonlösungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen, jedoch nur bei Belichtung. Gegenwart von CO_2 ist bei Peptonlösungen nicht notwendig. In beiden auch Vermehrung bei H_2S-Gegenwart. In Mineralsalzlösungen Vermehrung nur bei Gegenwart von H_2S. In Peptonnährböden CO_2-Assimilation nicht obligat. Wahrscheinlich C-mixotroph. In Pepton- und Mineralsalzlösungen wird H_2S verbraucht. Dabei keine S-Fällung, weder inner- noch außerhalb der Zellen.

Zellbeschaffenheit. Gewundene Zellen mit 3/4 Umgängen, 1,5 μ breit, 4 bis 6 μ lang. Eigenbewegung mittels Geißelschopfes. Nur unter ungünstigen Vermehrungsbedingungen werden die Zellen etwas dicker und vor allem sehr lang, so daß sie fünf bis acht enge oder weite Windungen bilden können. Einzelzelle farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien sind unter aeroben und anaeroben Bedingungen scharf begrenzt, schmal linsenförmig, dunkelkarminrot. Oberflächenkolonien in Wasserstoffatmosphäre kreisrund, erhaben, ganzrandig, wässerig glänzend, tief karminrot.

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Vorkommen. Anreicherungskulturen mit 1% *Witte*-Pepton und 0,1% Na_2S bei rund 5,5% O_2. Aus Faulschlamm des Waldteiches von Kuchelbad bei Prag, zwischen *Rhodopseudomonas Nr. 1* und *Phaeomonas Nr. 14.*

Die von *Molisch* (1907) in Rohkulturen unterschiedenen *Rhodospirillum*-Arten *photometricum* und *giganteum* gehören wohl zusammen, da man durch geeignete Lösungen aus den kurzen *Rhodospirillen* die auffallend langen und regelmäßig geformten Zellen (Degenerationsformen) erhalten kann. Die Zusammenhänge mußten *Molisch* verborgen bleiben, da er keine Reinkulturen besessen hat [s. auch *Schrammeck* (1934)].

Gattung *Chloropseudomonas nov. gen. nobis.* Stäbchenförmige Zellen mit einer polaren Geißel. In größeren Mengen von olivgrüner Färbung, welche im Alter in eine grünlichgelbe Färbung umschlägt.

Chloropseudomonas Nr. 1.

Vermehrung. Gut in Mineralsalzagar und Mineralsalzlösung (anaerob) bei Anwesenheit von H_2S, bei Belichtung und Gegenwart von CO_2. Dabei Verbrauch von H_2S beobachtet. In *Witte*-Peptonnährböden weder aerob noch anaerob Wachstum. Auf Peptonnährboden mit Hefekochsaft nach *Gaffron* in der Wasserstoffatmosphäre eine schwache Vermehrung nach Massenaussaat. S-Fällung weder inner- noch außerhalb der Zellen gesehen.

Zellbeschaffenheit. Stäbchen von 0,3 × 1,5 bis 3,0 μ mit Eigenbewegung. Ohne Zoogloeenbildung. Einzelzellen farblos.

Koloniebeschaffenheit. Tiefenkolonien kugelig, diffus konturiert, olivgrün. Oberflächenkolonien (Massenausstrich) erhaben, rund, ganzrandig, mit glänzender Oberfläche, olivgrün.

Färbbarkeit. Nur mit stark färbenden Lösungen hinreichend färbbar. *Gram*-negativ.

Vorkommen. Anreicherungskultur mit 1% *Witte*-Pepton, zwischen *Rhodopseudomonas Nr. 1* und *Phaeomonas Nr. 14.* Aus Faulschlamm des Waldteiches in Kuchelbad bei Prag.

Zusammenfassung.

Mit von verschiedenen Freilandstandorten stammendem Material wurden künstlich Biocoenosen hergestellt, in denen sich *Purpurbakterien* entwickelten. Aus ihnen konnten bisher sieben verschiedene Gruppen von Stämmen durch Gestalt, Färbung und Ernährungsansprüche eindeutig festgelegt werden. In einigen dieser Gruppen wurden früher beschriebene Organismen sicher erkannt. Wahrscheinlich

werden unter den roten Vertretern dieser Gesellschaften noch weitere, als eigene Systemeinheiten wenigstens physiologisch unterscheidbare Arten zu finden sein. Mit den roten Bakterien sind außer farblosen (aeroben wie anaeroben) auch verschiedene rein grün gefärbte Bakterien vergesellschaftet, welche bisher einer ausreichenden Beschreibung bzw. einer Isolierung nicht zugänglich waren.

Literatur.

W. Bavendamm, Die farblosen und roten Schwefelbakterien. Jena, Fischer, 1924. — *Derselbe*, Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. XII, Teil 2. Berlin, Urban u. Schwarzenberg, 1934. — *Derselbe*, Ergebn. d. Biol. **18**, 1936. — *J. Buder*, 1913, Biologenkalender 1914. — *Derselbe*, Jahrb. f. wiss. Bot. 58, 525, 1919. — *V. Czurda*, diese Zeitschr. 7, 110, 1936a; Ber. über d. II. Internat. Kongr. f. Mikrobiol. in London, 1936b. — *E. Esmarch*, Centralbl. f. Bakt. I. Abt., **1**, 225, 1887. — *A. J. Ewart*, Linn. Soc. Bot. **33**, 123, 1897. — *H. Gaffron*, Biochem. Zeitschr. **260**, 1, 1933; **269**, 447, 1934; **275**, 301, 1935; Ber. über d. II. Internat. Kongr. f. Mikrobiol. in London 1936. — *H. Gebauer*, Beitr. z. Biol. d. Pfl. 18, 445, 1930. — *J. Gietzen*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt., **83**, 183, 1931. — *T. Hama*, J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B, Div. 2, **1**, 135, 1933a; **1**, 157, 1933b. — *A. Itano* u. *S. Arakawa*, Ber. Ohara Inst. f. Landw. Forsch. **5**, 1932. — *P. Karrer* u. *U. Sohnssen*, Helv.Act. chim. 18, 1311, 1935. — *H. Kniep*, Jahrb. f. wiss. Bot. **48**, 215, 1906. — *A. J. Kluyver* u. *C. B. van Niel*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt., **94**, 369, 1936. — *R. Kolkwitz*, Schizomycetes, Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, Bd. 5. Leipzig, Borntraeger, 1909. — *K. B. Lehmann* u. *R. O. Neumann*, Bakteriologie und bakteriologische Diagnostik, 6. Aufl. München, Lehmann, 1920. — *W. Migula*, System der Bakterien, 2. Bd. Jena, Fischer, 1900. — *H. Molisch*, Die Purpurbakterien. Jena, Fischer, 1907. — *F. M. Müller*, diese Zeitschr. 4, 131, 1933. — *Derselbe*, Ber. über d. II. Internat. Kongr. f. Mikrobiol. in London 1936. — *C. B. van Niel*, Contr. to Marine Biology **161**, 1930. — *Derselbe*, diese Zeitschr. **3**, 1, 1931. — *Derselbe*, Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biology **3**, 138, 1935. — *Derselbe*, Ber. über d. II. Internat. Kongr. f. Mikrobiol. in London 1936. — *C. B. van Niel* u. *F. M. Müller*, Rec. d. Trav. Bot. Neerl. 28, 245, 1931. — *C. B. van Niel* u. *J. H. C. Smith*, diese Zeitschr. **6**, 219, 1935. — *E. G. Pringsheim*, Naturwiss. **20**, 479, 1932. — *P. A. Roelofsen*, The photosynthesis of the Thiorhodaceae, Diss. Utrecht 1935. — *E. Schneider*, Beitr. z. Biol. d. Pfl. 18, 81, 1930. — *Derselbe*, Zeitschr. f. phys. Chem. **226**, 221, 1934. — *Derselbe*, Rev. Fac. Sci. Univ. d'Istanbul Nouv. Ser. 1, 74, 1936. — *J. Schrammeck*, Beitr. z. Biol. d. Pfl. **22**, 315, 1934. — *C. Vahle*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt., **25**, 178, 1910.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Zytologische Untersuchungen an Bakterien mit Hilfe der Feulgenschen Nuclealreaktion *.

Von

Bernd Stille.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Februar 1937.)

Die Frage, ob in der Bakterienzelle in ähnlicher Weise wie in den Zellen höherer Lebewesen eine Sonderung von Kern und Zytoplasma verwirklicht ist, hat wegen ihrer grundsätzlichen Bedeutung im Laufe der letzten 5 Jahrzehnte zu einer Fülle von Untersuchungen geführt. So zahlreich die Arbeiten, so widersprechend sind die Ergebnisse.

Die älteren, bis zum Jahre 1912 erschienenen Arbeiten hat *A. Meyer* in seinem Werk „Die Zelle der Bakterien" ausführlich dargestellt. Einen eingehenden Bericht über den Stand der Zellkernfrage, wie er sich aus den später veröffentlichten Untersuchungen ergibt, hat *K. Pietschmann* 1931 erstattet. Auch *G. Tischlers* „Allgemeine Pflanzenkaryologie" und *A. Kiesels* „Chemie des Protoplasmas" behandeln die Zellkernfrage ausführlich.

Auf Grund der älteren unspezifischen Färbemethoden ist man im wesentlichen zu folgenden verschiedenen Auffassungen gekommen.

1. Die Bakterien entbehren des Zellkernes.
2. Die Bakterien besitzen einen echten Zellkern.
3. Die Kernsubstanz ist im Normalzustand diffus auf die gesamte Zelle verteilt und kann sich gelegentlich aus verschiedenen Gründen innerhalb der Zelle entmischen.
4. Die gesamte Bakterienzelle entspricht einem Zellkern.

Die Widersprüche werden verständlich, wenn man sich die Unzulänglichkeit der angewendeten Untersuchungsmethoden und die Kleinheit der Bakterien vergegenwärtigt, die einer zytologischen Erforschung die größten Schwierigkeiten entgegensetzen, dafür aber der Subjektivität der Deutungen um so mehr Spielraum lassen. Die Tatsache, daß manche Forscher einen Kern nicht finden konnten, darf nicht als ein Beweis für die tatsächliche Kernlosigkeit aufgefaßt werden; bedeutet doch ein Nichtnachweisenkönnen noch lange kein Nichtvorhandensein. Andererseits sind aber sicher auch Gebilde ganz verschiedener Art — Vakuolen, Reservestoffe, Sporenanlagen, Artefakte — als Kerne angesprochen worden.

Im Gegensatz zu den unspezifischen Färbemethoden ist die von *R. Feulgen* 1924 bekanntgegebene Nuclealreaktion insofern von besonderem Wert, weil sie infolge ihrer strengen Spezifität einen mikrochemischen Nachweis der Thymonucleinsäure ermöglicht. Dabei handelt es sich um einen

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

chemischen Körper, der in den Zellen höherer Organismen stets im Kern vorhanden ist und einen strukturbedingenden Faktor des Chromosomenaufbaues (*Casparsson*) bedeutet[1]. Infolgedessen ist die Nuclealreaktion auch bald zu zytologischen Untersuchungen an Bakterien herangezogen worden. Die dabei erzielten Ergebnisse sind jedoch keineswegs übereinstimmend.

Feulgen und *Rossenbeck* (1924) konnten bei *Bakterien* und *Hefen* keine Nuclealreaktion feststellen. *Feulgen* schloß daraus, daß bei diesen „phylogenetisch niedrigststehenden Formen" eine chemische Evolution der Thymonucleinsäure noch nicht erfolgt sei.

Voit erzielte als erster (1925 und 1927) eine positive Reaktion in dickeren Ausstrichen von *Bakterien* und *Hefen* und wies somit das Vorhandensein der Thymonucleinsäure in diesen Organismen nach.

Cunha und *Muniz* fanden 1929 bei 16 bis 18 Stunden alten Kulturen von *Bac. anthracis* in den Stäbchen die Nuclealreaktion an bestimmte Strukturen gebunden. Meist waren es zwei Körnchen, die sich im mittleren Teil der Zelle befanden. Bei Sporen konnte keine Nuclealreaktion erzielt werden.

Pokrowskaja untersuchte *Bac. pestis*. Bei parasitischer Lebensweise, wie es im natürlichen Zustand der Fall ist, gebe die gesamte Zelle eine diffuse Nuclealreaktion. Unter saprophytischen Lebensbedingungen dagegen entmische sich die Thymonucleinsäure innerhalb der Zelle; es bilde sich ein echter Kern, der zu amitotischer Teilung befähigt sei.

Kužela beobachtete bei verschiedenen Sporenbildnern eine diffuse Nuclealreaktion. Gelegentlich ließen sich in den Zellen jedoch auch nuclealpositive Körnchen oder netzartige Gebilde feststellen. Verfasser deutet die gesamte Bakterienzelle als Kernanalogon. Doch steht dieser Auffassung außer anderen Einwänden schon die Art der Sporenbildung innerhalb der Zelle im Wege.

Stapp und *Bortels* fanden bei *Pseudomonas tumefaciens* höchstens eine diffuse Anfärbung der gesamten Zelle, niemals aber Nuclealsubstanz in morphologisch differenzierter Form.

Nach *Pietschmann* und *Rippel* ist bei *Bac. mycoides* die nuclealpositive Substanz im Normalzustand diffus auf die gesamte Zelle verteilt; sie geht nicht restlos in die Spore ein und scheint bei der Zellteilung keine bestimmte Anordnung anzunehmen, die eine gleichmaßige Verteilung auf die Tochterzellen gewährleistet. Einwirkung von Lithiumchlorid und von Magnesiumsulfat soll eine Entmischung der nuclealpositiven Substanz innerhalb des Plasmas herbeiführen. Es handele sich dabei um Reizformen. Mit der Entmischung sei der Verlust der Vermehrungsfähigkeit verbunden.

Imšenecki beschrieb 1934 die Struktur des *Granulobacter pectinovorum*. Junge, einzeln gelagerte Zellen gäben eine diffuse Nuclealreaktion. In älteren Formen dagegen seien deutlich gefärbte Körnchen festzustellen. Ein nuclealpositives Polkörnchen führe entweder zur Bildung einer Spore oder zu einer „Knospe", in der Verfasser eine besondere Form der Vermehrungsfähigkeit sieht. Auch wird die Ausbildung eines positiv reagierenden „Clitellums" im mittleren Teil der Zelle beschrieben.

In deutlichem Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse, die der gleiche Autor 1936 bei den verschiedenartigsten *Bakterien* und auch bei *Hefen* bei

[1] Die ausführliche Monographie von *Milovidov* (1936) kann leider, da sie russisch geschrieben ist, nicht herangezogen werden.

Anwendung der Nuclealreaktion erzielte. Bei größeren Anhäufungen dieser Organismen fand Verfasser eine positive Reaktion. Bei mikroskopischer Betrachtung ließen sich weder diffuse Anfärbung der Zelle noch vom Plasma gesonderte nuclealgefärbte Strukturen beobachten. Die Zellen erschienen völlig farblos. Verfasser vermutet, daß die *Hefe*kerne und die „Chromatinkörner“ und „Prosporen“ der *Bakterien* infolge ihres geringen Umfanges eine so schwache Nuclealfärbung zeigten, daß die violette Anfärbung erst bei größeren Anhäufungen der Mikroorganismen, nicht aber in der einzelnen Zelle wahrnehmbar sei.

Endlich sei noch auf die Arbeit von *Milovidov* (1935) verwiesen. Verfasser beschreibt für die jungen Stadien von *Bac. mycoides*, *Bac. megaterium* und *Bac. anthracoides* eine diffuse Verteilung der Nuclealstoffe. Später jedoch könne eine Kondensation derselben zu kompakten, positiv reagierenden Gebilden eintreten.

Die mit Hilfe der Nuclealreaktion erzielten Ergebnisse sind also zum Teil recht widersprechend. Dafür dürften außer der Subjektivität der Deutungen u. a. auch noch folgende Gründe verantwortlich sein:

1. Die Nuclealreaktion ist eine Postvitalfärbung. Dabei wissen wir jedoch nicht, ob nicht innerhalb der Bakterienzelle mit dem Tode grundlegende Veränderungen in bezug auf den kolloidalen Zustand und die Lokalisation der Thymonucleinsäure eintreten.

Da die Thymonucleinsäure eine selektive Absorption für ultraviolette Strahlen zeigt, wäre es wünschenswert, zu versuchen, die Ergebnisse, die wir mit der Nuclealreaktion über den Bau der fixierten Bakterienzelle erzielen, mit Hilfe der Ultraviolettabsorption auch am lebenden Material sicherzustellen[1].

2. Die Thymonucleinsäure gibt erst nach vorheriger Hydrolyse die Aldehydreaktion.

Bei zu schwacher Hydrolyse bleibt die Reaktion aus, so daß der Trugschluß nahegelegt wird, es sei keine Thymonucleinsäure in der Zelle vorhanden.

Die Nuclealreaktion fällt positiv aus, sobald durch die Hydrolyse von der hochmolekularen Thymonucleinsäure die Purinkörper Guanin und Adenin abgespalten sind; sie bleibt weiterhin positiv, bis die Thymonucleinsaure weitgehend abgebaut ist und nur ein niedrig molekularer Restkörper (nach *Levene* handelt es sich um eine Pentose, die d-2-Ribodesose) übriggeblieben ist, der leicht löslich ist. Es ist also durchaus möglich, daß je nach Dauer und Temperatur der Hydrolyse verschieden stark lösliche Abbaustufen der Thymonucleinsäure und damit Lokalisationsänderungen der nuclealpositiven Substanz erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde u. a. auch besondere Beachtung der Frage geschenkt, ob bei den Bakterien extreme Lebensbedingungen

[1] Herr Dr. *Meyer* hat am hiesigen Institut diesbezügliche Untersuchungen eingeleitet, die indessen aus finanziellen Gründen noch nicht weitergeführt werden konnten.

den Ausfall der Nuclealreaktion irgendwie beeinflussen können, und ferner, ob sich bei gleichem Versuchsmaterial durch Variation der Methodik der Nuclealfärbung verschiedene Ergebnisse erzielen lassen.

Material und Untersuchungsmethode.

Mit Ausnahme eines selbstisolierten Sporenbildners, der sich infolge einer zufälligen Infektion auf Dextroseagar einstellte, im nachfolgenden als *Bacillus* aus der *Megaterium*-Gruppe bezeichnet, stammten sämtliche untersuchten Bakterienarten aus Reinkulturen, die im hiesigen Institut gezüchtet waren. Im wesentlichen handelte es sich dabei um folgende Arten: *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus fuscus* und *Bac. mycoides*. Doch wurden außerdem zum Vergleich noch *Bac. robur*, *Bac. ruminatus*, *Bac. megaterium*, *Bac. Ellenbachensis*, *Bac. amylobacter*, ferner *Azotobacter*, *Sarcinen*, *Actinomyceten*, einige *Hefe*-Arten und Gewebestücke höherer Pflanzen der Nuclealreaktion unterzogen.

Die Kultur der Bakterienstämme erfolgte im allgemeinen auf Nährboden Nr. 3[1] oder auf Dextroseagar[2], auf denen alle untersuchten Arten gutes Wachstum zeigten. Doch wurden zu Vergleichszwecken — wie an anderer Stelle noch ausführlich berichtet werden soll — auch noch zahlreiche andere Nährböden bzw. Nährlösungen verwendet, um abgeänderte Lebensbedingungen zu schaffen.

Zur Anfertigung von Nuclealpräparaten wurde entweder flüssigen wie festen Kulturen Material mit der Platinöse entnommen und auf dem Deckglase verrieben, oder es wurden bei Plattenkulturen Abklatschpräparate durch Auflegen eines Deckglases gemacht.

Das Fixieren erfolgte durchweg in Sublimatalkohol (nach *Schaudinn*), doch wurde zur Kontrolle außerdem noch mit *Carnoy*scher Flüssigkeit, Sublimat-Eisessig (nach *Lang*), Essigsäuredämpfen und 70%igem Alkohol gearbeitet.

Die fixierten Präparate wurden die Alkoholreihe hinaufgeführt und mindestens 48 Stunden in 96%igem Alkohol, dem 1% Dimedon (Dimethylcyclohexandion) zugesetzt war, behandelt, um eine Plasmalogenreaktion zu verhindern und möglicherweise vorhandene freie Aldehyde vorher abzufangen.

Die Hydrolyse wurde in n HCl ursprünglich bei 60° C 6 bis 12 Minuten lang durchgeführt; später wurde, wie besondere Versuche beschreiben, zum Studium der Hydrolysenwirkung die Temperatur und die Dauer der Hydrolyse weitgehend variiert. Dabei wurde als optimale Bedingung eine Temperatur von 40° bei einer Dauer von 60 Minuten gefunden.

Als Hydrolysegefäße dienten kleine Bechergläser, in denen die Präparate aufrecht standen. Ein größerer, die Bechergläser allseitig umgebender Wassermantel sorgte für die Konstanterhaltung der gewünschten Temperatur während der Hydrolysedauer.

---

[1] Nährlösung Nr. 3: Pepton 1,0 g und Agar 1,5 g zu 100 ccm mineralische Nährlösung. Mineralische Nährlösung: 10 ccm 10%ige K_2HPO_4, 30 ccm 1%ige $MgSO_4$, 10 ccm 1%ige NaCl, 1 ccm 1%ige Fe_2Cl_6, 949 ccm Aqua dest. Lackmusneutral (nach *Gottheil*, Centralbl. f. Bakt. II, 7, 432, 1901). — [2] Dextroseagar: Pepton-*Witte* 1,2 g, *Liebigs* Fleischextrakt 0,8 g, NaCl 0,2 g, Dextrose 1,0 g, Agar 1,6 g, Aqua dest. zu 100,0 ccm. Lackmusneutral.

Nach drei- bis fünfstündigem Verweilen in fuchsinschwefliger Säure wurden die Präparate mindestens eine halbe Stunde, oft noch länger, sorgfältig in wiederholt erneuertem SO_2-haltigem Wasser gespült, um alle überschüssigen, nicht an der Nuclealreaktion beteiligten Reste der fuchsinschwefligen Säure zu entfernen. Dadurch wurde die Möglichkeit einer später auftretenden Pseudofärbung verhindert. Da sich herausstellte, daß vor allem *Azotobacter* — wohl infolge der Schleimschicht —, ferner Sporen und *Sarcinen* die letzten Reste der fuchsinschwefligen Säure besonders hartnäckig festhalten, wurde die SO_2-Wässerung bei diesen Präparaten auf mehrere Stunden ausgedehnt.

Nach kurzem Spülen in klarem Wasser wurden die Nuclealpräparate alsdann in Glycerin auf dem Objektträger eingebettet.

Gelegentlich wurden auch größere Bakterienmassen, vor allem Suspensionen von Bakterien, die in Nährlösungen gewachsen waren, im Zentrifugenglas mit den einzelnen Agenzien behandelt und der *Feulgen*schen Nuclealreaktion unterzogen.

Selbstverständlich wurden zum Vergleich stets Kontrollpräparate ohne vorherige Hydrolyse herangezogen.

Plasmagegenfärbungen erfolgten mit einer 0,6 %igen Lösung von *Bechers* Alizarinviridin.

Bei den mikroskopischen Beobachtungen und zur Mikrophotographie diente eine 5 Amp. Gleichstrombogenlampe als Lichtquelle.

Die Sicherheit des Nachweises der nuclealgefärbten Zellbestandteile konnte durch die Verwendung eines grünen Farbfilters erheblich gesteigert werden[1]. Das Filter erwies sich vor allem aus zwei Gründen als vorteilhaft: es ermöglichte durch die Dämpfung der Gesamtintensität des Bogenlichtes ein Mikroskopieren bei voller Blendenöffnung, ohne das Auge zu überanstrengen. Ferner ließ es die nuclealgefärbten Zellbestandteile kontrastreicher hervortreten infolge Absorption derjenigen Spektralbereiche, die normalerweise das Violett der nuclealgefarbten Strukturen durchdringen.

Die Mikrophotos sind im Hellfeld in der *A. Kohler*schen Anordnung mit Homal IV, aplanatischem Kondensor, Öffnungszahl 1,4, bei voller Blendenöffnung aufgenommen. Als Objektiv diente eine Ölimmersion, Apochromat mit einer numerischen Apertur von 1,3 und einer Eigenvergrößerung von 120 : 1. Die Vergrößerung beträgt bei sämtlichen Photogrammen ungefähr 1700 : 1. Als Negativmaterial diente *Hauff* „Ortho-Lichthoffrei“ 19 bis 20° Sch.; für die Abzüge wurde „Agfa Lupex Ultra hart“ gewählt.

Ergebnisse.

Makroskopischer Ausfall der Nuclealreaktion.

Unter den beschriebenen Bedingungen fiel bei sämtlichen untersuchten Arten nach vorheriger Hydrolyse die Nuclealreaktion makroskopisch stets positiv aus. Ausstriche von jungem wie von altem Material zeigten in gleicher Weise die Nuclealreaktion. Bereits nach 5 bis 10 minutenlangem Verweilen in fuchsinschwefliger Säure stellte sich die Violettfärbung ein. Dagegen blieben die nicht hydrolysierten Kontroll-

---

[1] Als Filter diente eine Glasküvette, die mit folgender Farbmischung angefüllt war: 3,0 ccm Orange G, 1 %, wässerig; 8,0 ccm Methylenblau, 1 ‰, wässerig; 100,0 ccm Aqua dest. Innere Weite der Küvette 0,7 cm.

präparate selbst nach einstündigem Verweilen in der fuchsinschwefligen Säure noch völlig ungefärbt.

Jedoch darf man die Kontrollpräparate nicht noch längere Zeit der Einwirkung der fuchsinschwefligen Säure aussetzen, da diese sonst allmählich eine Hydrolyse der Thymonucleinsäure einleitet und damit eine Nuclealreaktion herbeiführt.

Über die Menge der nuclealpositiven Substanz bei dem verschiedenen Material läßt sich auf Grund der Farbintensität natürlich nichts aussagen, da die Ausstriche niemals von gleicher Dicke sind. Ferner braucht die Hydrolyse der Thymonucleinsäure auch nicht quantitativ verlaufen zu sein, so daß infolgedessen auch keine maximale Anfärbung zu erwarten ist.

Zytologische Befunde.

Bei mikroskopischer Beobachtung zeigten die nuclealgefärbten Bakterienausstriche nicht stets das gleiche Bild. Entweder waren sämtliche Bakterien im Nuclealpräparat gleichmäßig diffus angefärbt, oder aber die Nuclealreaktion beschränkte sich auf ganz bestimmte Gebilde innerhalb des Zelleibes. Das übrige Plasma war dann völlig ungefärbt, wie durch Gegenfärbung mit Alizarinviridin festgestellt werden konnte.

Zellen, die eine diffuse Nuclealfärbung zeigen, nehmen bei Gegenfärbung mit Alizarinviridin eine schmutziggraue Mischfarbe an. Im Gegensatz dazu erscheint das Plasma jener Zellen, in denen die Nuclealreaktion an bestimmte Strukturen gebunden ist, nach Gegenfärbung mit Alizarinviridin in einem klaren Grün.

Dieser unterschiedliche Ausfall der Nuclealreaktion konnte bei sämtlichen untersuchten Arten beobachtet werden. Dabei handelte es sich in beiden Fällen um eine echte Aldehydreaktion. Durch stundenlanges Spülen in SO_2haltigem Wasser ließ sich keine Entfärbung herbeiführen, so daß also eine Pseudoreaktion (Anfärbung der Zelle infolge hydrolytischer Spaltung der überschüssigen fuchsinschwefligen Säure) für den unterschiedlichen Ausfall nicht verantwortlich ist.

Wie im Verlauf der Arbeit nachgewiesen wird, sind die nuclealpositiven Gebilde innerhalb der Bakterienzelle durch Kultivieren unter extremen Lebensbedingungen in ihrer Größe und Anzahl nicht nach Art eines Reservestoffes zu beeinflussen. Da also das Substiat keinen Einfluß auf den Ausfall der Nuclealreaktion ausübt, kann es sich auch nicht um eine durch „Reizwirkung" herbeigeführte „Entmischung" der nuclealpositiven Substanz handeln. Ferner konnten die nuclealpositiven Gebilde in zweifellos jungen Bakterien bereits nachgewiesen werden; sie können infolgedessen nicht als frühe Stadien von Sporenanlagen aufgefaßt werden. Da bei Anwendung der verschiedenen Fixiermittel das Zellbild stets in gleicher Weise dargestellt wurde, ist die

Fixage nicht für den unterschiedlichen Ausfall verantwortlich. Dagegen kann durch die Einwirkung der Hydrolyse — je nach Dauer und Temperatur — die ursprünglich strukturgebundene Thymonucleinsäure derart weitgehend gespalten werden, daß die reaktionsgebenden Endprodukte der Spaltung sich infolge ihrer Leichtlöslichkeit auf die gesamte Zelle verteilen und somit eine diffuse Nuclealreaktion hervorrufen.

Im folgenden soll über die bei den einzelnen Bakterienarten beobachteten nuclealpositiven Gebilde und ihre Anordnung innerhalb der Zelle berichtet werden. Besondere Beachtung wurde dabei dem Verhalten während der Zellteilung, der Sporenbildung, des weiteren Nachreifens der Sporen und der Sporenkeimung geschenkt.

Bacillus aus der Megaterium-Gruppe.

Verhalten während der Zellteilung: Im Nuclealpräparat, das Material einer 15 Stunden alten Kultur enthielt, befanden sich ausschließlich vegetative Stadien. Im Plasma jeder einzelnen Zelle waren nuclealpositive Gebilde zu beobachten, über deren Anordnung Abb. 1 eine Übersicht gibt.

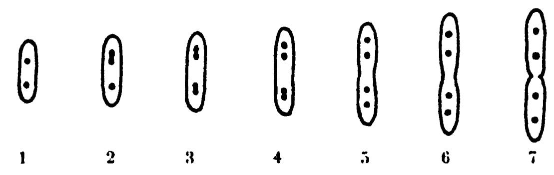


Abb. 1. Verhalten der nuclealpositiven Gebilde bei *Bacillus* der *Megaterium*-Gruppe. Schematisch.

Die Stadien 5 bis 7 zeigen bereits äußerlich, daß sie sich in Zellteilung befinden. Bei 7 ist diese schon soweit fortgeschritten, daß die beiden Tochterzellen nur noch lose miteinander in Verbindung stehen. Dagegen sind bei den kleineren Zellen 1 bis 4 äußerlich keine Anzeichen festzustellen, die auf eine beginnende Zellteilung hindeuten.

Zahl und Anordnung der nuclealpositiven Gebilde innerhalb der Zelle lassen eine gesetzmäßige Beziehung zur Zellteilung erkennen.

Die einzelne Zelle enthält mindestens zwei, höchstens aber vier nuclealpositive Körnchen. Sobald das „Vierkörnchenstadium" erreicht ist, tritt eine Zellteilung ein, so daß damit das „Zweikörnchenstadium" für die beiden Tochterzellen wiederhergestellt ist. Jedes Körnchen teilt sich durch Einschnürung. Es entsteht zunächst ein hantelförmiges Gebilde. Schließlich verschwindet die Verbindungsbrücke, und die beiden Tochterkörnchen trennen sich; hierdurch ist das „Vierkörnchenstadium" wiederhergestellt.

Gelegentlich sind auch Zellen zu beobachten, in denen die Teilung des einen Körnchens bereits beendet ist, während das andere sich noch

in Teilung befindet. Sie enthalten also drei nuclealpositive Gebilde und stellen ein Zwischenstadium dar.

Die Körnchenteilung geht also der Zellteilung zeitlich um eine Generation voraus, da jeder Tochterzelle zwei Körnchen mitgegeben werden.

Diese Beobachtungen schließen nicht aus, daß die Normalzahl je Zelle nur *ein* Körnchen ist. Es ist jedoch nicht möglich, dieses Ruhestadium zu fassen, da sich die Bakterienzelle — wie es auch in ihrem intensiven Stoffwechsel sich ausdrückt — in lebhafter Teilung befindet.

Die nuclealpositiven Gebilde lassen weitere Feinheiten ihres strukturellen Aufbaues nicht erkennen, da sie infolge ihrer geringen Größe (0,3 bis 0,4 μ) die Auflösungsgrenze des Mikroskopes erreichen.

Die Körnchen lassen sich nicht als Plasmolyseerscheinungen deuten, und zwar:

1. aus theoretischen Erwägungen: sie sind zu klein, um durch Plasmolyse herbeigeführt sein zu können.

Die Größe einer im „Zweikörnchenstadium" befindlichen Zelle beträgt $5 \times 1\ \mu$; sie hat also — als Zylinder berechnet — ein Volumen von $4\ \mu^3$. Die nuclealpositiven Körnchen haben einen Durchmesser von höchstens 0,4 μ. Als Kugel berechnet beträgt das Volumen für jedes einzelne $0{,}033\ \mu^3$, für beide zusammen also $0{,}066\ \mu^3$. Nimmt man nun für den osmotischen Wert der Bakterienzelle 8 Atm. an, was sicher nicht zu hoch gegriffen ist, so wären $\frac{4\,.\,8}{0{,}066} = 485$ Atm. nötig, um den Protoplasten auf diese geringe Große zu reduzieren.

2. Die sporenbildenden Bakterien sind aber auch gar nicht plasmolysierbar.

Sämtliche, im Verlauf der Arbeit beschriebenen Bakterien wurden der Einwirkung von Kochsalz- und Rohrzuckerlösungen verschiedener Konzentration ausgesetzt. Dabei konnte in den hypertonischen Lösungen niemals eine Plasmolyse beobachtet werden.

Die nuclealgefärbten Gebilde sind ferner nicht als frühe Stadien von Sporenanlagen anzusprechen aus folgenden Gründen:

1. Sie wurden in jungen Stäbchen, die sich noch in lebhafter Teilung befanden, beobachtet. Ein 1 Liter *Erlenmeyer*-Kolben, der in flacher Schicht 100 ccm D-Lösung[1] enthielt, wurde mit Sporenmaterial aus einer 120 Tage alten Kultur beimpft und dann 10 Minuten lang auf 80^0 erhitzt, um alle vegetativen Formen, falls solche beim Überimpfen mit hineingelangt sein sollten, abzutöten. Die Kultur erfolgte im Brutschrank bei 37^0 C.

[1] D-Lösung: Pepton-*Witte* 1,2 g; *Liebig*s Fleischextrakt 0,8 g; NaCl 0,2 g; Dextrose 1,0 g; Aqua dest. zu 100 ccm; lackmusneutral.

Nach 10 Stunden konnten bei mikroskopischer Kontrolle bereits zahlreiche, lebhaft bewegliche Stäbchen festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden der Kultur 20 ccm Flüssigkeit mittels einer sterilen Pipette entnommen und alsdann zentrifugiert. Es setzte sich im Zentrifugenglas nur ein ganz geringes Sediment ab, das zu Ausstrichen für Nuclealpräparate benutzt wurde. Dabei zeigten sämtliche Zellen dieser jungen Kultur in gleicher Weise die nuclealpositiven Gebilde.

Vergleichshalber wurden der gleichen Flüssigkeitskultur nach weiteren 10 Stunden — also 20 Stunden nach dem Beimpfen — nochmals 20 ccm entnommen und zentrifugiert. Dabei wurde ein wesentlich größeres Sediment erzielt.

Die Bakterienmasse, je 20 ccm Nährlösung, hat sich also in diesen nachfolgenden 10 Stunden noch erheblich vermehrt. Infolgedessen müssen die einzelnen Stäbchen während dieser Zeit noch zahlreiche Zellteilungen durchlaufen haben, um diese größere Masse zu bilden. Daß jedoch die Stäbchen Sporenanlagen ausbilden, solange sie sich noch lebhaft durch Teilung vermehren, ist unwahrscheinlich.

2. Die Größe der nuclealpositiven Gebilde erweist sich innerhalb sehr enger Grenzen als konstant.

Würde es sich bei den Gebilden um Sporenanlagen handeln, so müßte man auch beträchtliche Größenunterschiede — bedingt durch ein allmähliches Anwachsen der Anlage bis zur vollen Sporengröße — in den verschiedenen Zellen feststellen können.

3. Die Sporenbildung selbst konnte beobachtet werden. Dabei ließ sich feststellen, daß die Sporen sich aus Anfangsstadien entwickeln, die keine Nuclealreaktion zeigen. Vielmehr wird jeder Spore im Verlauf ihrer Entwicklung in der Mutterzelle ein nuclealpositives Gebilde zugeteilt.

Verlauf der Sporenbildung. Die zukünftige Spore läßt sich bereits in frühen Anlagestadien schon in der ungefärbten Mutterzelle erkennen. In jeder Zelle entsteht ein Bezirk, der sich durch sein größeres Lichtbrechungsvermögen vom übrigen Plasma deutlich abhebt und allmählich zur vollen Sporengröße heranwächst. Die Mutterzelle kann dabei eine ganz geringe seitliche Anschwellung erfahren. Selten liegt die Spore genau in der Zellmitte; meist ist sie dem einen Zellende etwas genähert. Jede Mutterzelle bringt stets nur eine Spore hervor.

Besondere Beachtung wurde dem Verhalten der nuclealpositiven Substanz während der Sporenbildung geschenkt. Dabei ergab sich, daß im Nuclealpräparat nicht die gesamten Sporenanlagen gefärbt werden, sondern daß die Nuclealreaktion sich in jeder Zelle auf zwei Körnchen beschränkt, die erheblich kleiner sind als die Sporenanlage. Das eine liegt frei im Zellplasma und geht später — nach dem Freiwerden

der Spore — mit dem Mutterzellrest zugrunde, während das andere sich am Aufbau der Spore beteiligt.

An Hand der einzelnen Stadien, wie sie sich im nuclealgefärbten Material finden, ist auf folgenden Verlauf der Sporenbildung zu schließen: Jedes vegetative Stäbchen, das sich zur Sporenbildung anschickt, enthält zwei nuclealpositive Körnchen von gleicher Größe. Eines davon wird durch die heranwachsende Sporenanlage — die, wie bereits beschrieben, nicht genau in der Zellmitte, sondern meist dem einen Zellende etwas genähert entsteht — aus seiner ursprünglichen Lage verdrängt. Es liegt infolgedessen stets peripher an der jungen Sporenanlage, nie in deren Zentrum (s. Abb. 2). Die Sporenanlage umgibt sich schließlich mit einer Membran, die das Körnchen mit einschließt.

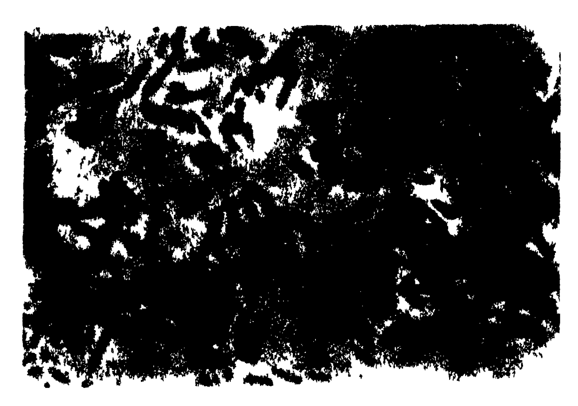


Abb. 2. *Bacillus* aus der *Megaterium*-Gruppe. Vegetative Stadien und Sporenbildung in 2 Tage alter Kultur auf D-Agar. *Feulgen*-Färbung. Vergr. 1710 mal.

Das zweite nuclealpositive Gebilde, welches sich außerdem in der Mutterzelle befindet, bleibt an der Sporenbildung völlig unbeteiligt und geht später beim Zerfall der Zelle mit dem Restkörper zugrunde.

Die jungen freien Sporen zeigen das gleiche Aussehen wie bereits vorher in der Mutterzelle. Nie fehlt das seitlich gelegene nuclealgefärbte Körnchen.

Pietschmann und *Rippel* fanden bei den freien Sporen von *Bac. mycoides* ebenfalls ein peripher gelegenes nuclealpositives Gebilde. Verfasser vermuteten, daß es sich dabei um einen der Sporenmembran außen anhaftenden Plasmarest der zugrunde gegangenen Sporenmutterzelle handele.

Infolge der geringen Dimensionen der Strukturen bereitet es die größten Schwierigkeiten, mit unseren optischen Hilfsmitteln eine eindeutige Entscheidung darüber zu gewinnen, ob das peripher gelegene nuclealpositive Gebilde der Sporenmembran *außen* angelagert ist, oder ob es sich an der Innenseite der Membran, also *in* der Spore, befindet.

Doch erschien die Klärung dieser Frage besonders wichtig; denn hier mußte auch die Entscheidung liegen, ob das Gebilde etwa nur als ein zugrunde gehender Plasmarest der Sporenmutterzelle[1] oder aber als ein wesentlicher Bestandteil der Spore selbst anzusprechen ist.

Nachreifen der Sporen. Deshalb wurde auch älteres Sporenmaterial zur Untersuchung herangezogen, um möglicherweise durch das Altern bedingte Veränderungen der Sporen zu verfolgen.

Zunächst ließ sich feststellen, daß die Sporen mit zunehmendem Alter bald eine deutliche Volumenverminderung infolge Wasserverlust erfahren.

Junge Sporen, gewachsen auf Nährboden Nr. 3, hatten im Mittelwert folgende Größe: Länge 1,68 μ, Breite 1,12 μ; *120 Tage alte Sporen* gleicher Herkunft dagegen: Länge 1,45 μ, Breite 0,92 μ.

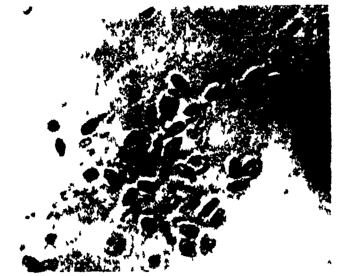


Abb. 3. *Bacillus* aus der *Megaterium*-Gruppe Sporen 120 Tage alt. *Feulgen*-Färbung. Vergr. 1680 mal.

Die 120 Tage alte Kultur enthielt nur freie Sporen; vegetative Stadien waren nicht mehr zu finden. Schon äußerlich ließ sich der Kultur ansehen, daß das Wachstum zum Stillstand gekommen war: der Nährboden war bis auf ein Viertel seines ursprünglichen Volumens eingetrocknet: das Bild des Impfstriches hatte schon seit Wochen keine Veränderung mehr erfahren.

Die Nuclealfärbung ergab bei diesem alten Sporenmaterial ebenfalls eine positive Massenreaktion.

Bei mikroskopischer Beobachtung war in jeder Spore auch das nuclealpositive Gebilde wiederzufinden, und zwar erschien es nunmehr überraschenderweise zumeist nicht peripher, wie bei den jungen Sporen, sondern *zentral* im Sporeninnern.

Durch folgende weitere Beobachtungen ließ sich mit Sicherheit nachweisen, daß das Kornchen sich tatsächlich im Sporeninnern befindet.

1. Bei leichtem Druck auf das Deckglas lösen sich stets einige Sporen los und werden durch die auftretende Strömung des Einbettungsmittels (Glycerin) mitgerissen. Verfolgt man diese Sporen, so läßt sich feststellen, daß sie in diesem Strom nicht gleiten, sondern zuweilen langsame Drehbewegungen ausführen. Während dieser Drehung erscheint das Körnchen zentral in der Spore; würde es der Membran außen

[1] Gegen diese Annahme spricht allerdings schon der Verlauf der Sporenbildung und die Regelmäßigkeit, mit der das Gebilde bei den freien Sporen auftritt.

anhaften, so müßte es exzentrisch rotieren und somit bald auf dieser, bald auf jener Sporenseite erscheinen.

2. Sporen, die sich in dünnflüssigem Medium — vor allem in Wasser — befinden, zeigen oft *Brown*sche Bewegung. Sie führen ungeordnete Drehungen und Richtungsänderungen aus, so daß man sie allseitig beobachten kann; dabei läßt sich deutlich die Lage des Gebildes im Sporeninnern feststellen.

3. Bringt man Sporen zum Auskeimen (vgl. Sporenkeimung, S. 136 f.), so sind an den leeren Sporenhüllen, sobald sie vom Keimstäbchen verlassen sind, niemals nuclealpositive Gebilde nachzuweisen. Daraus ergibt sich, daß die Nuclealsubstanz bei den ungekeimten Sporen im Zellinnern lokalisiert ist und beim Auskeimen dem jungen Stäbchen mitgegeben wird.

Um die Lage des nuclealpositiven Gebildes innerhalb der Spore — ob zentral oder seitlich — statistisch zu erfassen, wurde im Okular des Mikroskops mit Tusche ein kleines quadratisches Feld eingezeichnet und die jeweils in diesem Felde befindlichen Sporen untersucht. Von insgesamt 1046 Sporen wurde das Körnchen in 922 Fällen, also bei 88%, zentral und in 29, also 3%, seitlich gefunden. Bei den übrigen 95 Sporen (= 9%) ließ sich nicht sicher entscheiden, ob zentral oder seitlich.

Zur weiteren mikroskopischen Kontrolle wurden außerdem noch Sporen gleicher Herkunft ungefärbt im Dunkelfeld bzw. nach Intensivfärbung im Hellfeld beobachtet. Im Dunkelfeld waren bei diesen stark lichtbrechenden alten Sporen niemals irgendwelche, der Membran anhaftende Plasmareste zu erkennen; die gleiche Feststellung ließ sich auch bei ungefärbten Sporen im Hellfeld machen. Mit Methylenblau, Carbolfuchsin und Gentianaviolett intensiv gefärbte Sporen zeigten — auch bei nachfolgender Behandlung in verdünnten Sauren bzw. in Alkohol — stets eine gleichmäßige Anfärbung. Innengebilde waren bei den so behandelten Sporen — im Gegensatz zu den nuclealgefärbten — niemals festzustellen.

Sporenkeimung: Anschließend wurde das Verhalten der nuclealpositiven Substanz während der Sporenkeimung verfolgt.

Es war dabei wesentlich, von reinem Sporenmaterial, das keine vegetativen Stadien mehr enthielt, auszugehen. Nur so ließ sich mit Sicherheit nachweisen, daß die später in der Kultur auftretenden vegetativen Formen nicht etwa mit dem Impfmaterial unmittelbar eingeschleppt, sondern erst durch Keimung aus den Sporen hervorgegangen waren. Aus diesem Grunde wurde einer 150 Tage alten, durch Austrocknen bereits stark eingeschrumpften Agarkultur, auf der das Wachstum seit langem völlig zum Stillstand gekommen war, reichlich Impfmasse entnommen und in Reagensgläser mit frischer D-Lösung übertragen. Sofort nach dem Beimpfen wurden die Röhrchen 10 Minuten lang einer Temperatur von 80° ausgesetzt,

um vegetative Stadien, falls sie überhaupt mit hineingelangt sein sollten, zu vernichten. Die Kultur erfolgte im Brutschrank bei 25°. In bestimmten Zeitabständen, 0, 1, 2, 4, 6, . . ., 24 Stunden, wurden Ausstriche gemacht und der Nuclealreaktion unterzogen. Auf diese Weise ließ sich der Verlauf der Keimung und die Lokalisation der Thymonucleinsäure während der einzelnen Phasen verfolgen. Dabei ergab sich, daß bei diesen alten Sporen ein Auskeimen bedeutend später erfolgt als bei jungen Sporen. Entscheidend dafür ist, daß bei den alten Sporen der Impuls zur Quellung durch Wasseraufnahme sehr verzögert eintritt. Sobald die Quellung jedoch eingeleitet ist, verläuft sie mit großer Geschwindigkeit und führt bald zum äquatorialen Aufplatzen der Sporenmembran und damit zum Ausschlüpfen des jungen Keimstäbchens.

Die Nuclealpräparate, die Ausstriche von Material, das 0 bis 6 Stunden lang bebrütet war, enthielten, zeigten untereinander die größte Übereinstimmung. Die Sporen hatten in dieser Zeit noch keine Größenzunahme erfahren und zeigten im Innern das violett gefärbte Körnchen.

Im 8 Stunden alten Material befanden sich außer noch unveränderten Sporen manche, die durch Quellung eine deutliche Größenzunahme erfahren hatten; ungefärbt erwiesen sie sich als weniger stark lichtbrechend als die noch nicht gequollenen Sporen. Die Nuclealreaktion hatte bei den gequollenen Sporen das gleiche Ergebnis wie bei den ungequollenen.

Nach 10 Stunden waren ungequollene Sporen kaum mehr zu finden, dagegen konnten bereits zahlreiche Keimstäbchen und auch einzelne verlassene Sporenhüllen beobachtet werden. Diese Hüllen ließen zum Teil deutlich erkennen, daß die Keimung äquatorial erfolgt sein mußte. Nuclealpositive Substanz war an diesen Sporenhüllen in keinem Fall mehr nachzuweisen. Daraus ergibt sich mit größter Eindeutigkeit, daß die bei den noch nicht ausgekeimten Sporen nachgewiesenen nuclealpositiven Körnchen im Sporeninnern lokalisiert sind und den jungen Stäbchen beim Auskeimen mit auf den Weg gegeben werden.

Die jungen Keimstäbchen befinden sich bereits wieder im „Zweikörnchenstadium". Da die Spore nur *ein* nuclealpositives Körnchen enthält, muß die Körnchenteilung sofort während der Keimung einsetzen.

Niemals konnten im Nuclealpräparat Keimstäbchen, die gerade im *Ausschlüpfen* aus der Sporenhülle begriffen waren, festgestellt werden. Das Ausschlüpfen dürfte so schnell verlaufen, daß es nicht möglich ist, diesen Augenblick im fixierten Material zu erfassen.

Weitere Bakterien.

Die mit Hilfe der Nuclealreaktion an diesem *Bacillus* gewonnenen Ergebnisse wurden an einem Stamm von *Bac. megaterium*, der der Sammlung des Instituts angehörte, nachgeprüft. Dabei wurden übereinstimmende Bilder gewonnen.

In gleicher Weise wurden noch mehrere andere sporenbildende Bakterienarten untersucht. Dabei konnten bei allen Arten ebenfalls nuclealpositive Körnchen festgestellt werden. Sie zeigten in ihrer Anordnung innerhalb der Zelle und in ihrem Verhalten bei der Zellteilung, der Sporenbildung und der Sporenkeimung die größte Übereinstimmung mit den vorhin beschriebenen Strukturen des *Bacillus* aus der *Megaterium*-Gruppe.

Bac. subtilis: Im Nuclealpräparat einer 10 Stunden alten, also sehr jungen Kultur von *Bac. subtilis* zeigten die einzelnen Zellen Körnchen mit positiver Reaktion im ungefärbten Plasma. Dabei konnte ebenfalls das „Zweikörnchenstadium" und das „Vierkörnchenstadium" beobachtet werden. Die Zellteilung erfolgt erst, wenn das „Vierkörnchenstadium" erreicht ist.



Abb. 4. *Bacillus subtilis.* Kultur 20 Stunden alt. *Feulgen*-Färbung. Vergr. 1710 mal.

Durch Ausmessen wurden fur *Bac. subtilis*, gewachsen auf D-Agar, folgende Durchschnittswerte gefunden: Breite: 0,73 μ, Lange: 2,7 μ im „Zweikörnchenstadium", 5,1 μ im „Vierkörnchenstadium".

Die nuclealpositiven Körnchen zeigen bei der Sporenbildung das gleiche Verhalten wie bei *Bac. megaterium*. In jeder Spore ist ebenfalls ein violettes Körnchen sichtbar. Verlassene Sporenhüllen geben keine Nuclealreaktion.



Abb. 5. *Bacillus mycoides.* Kultur 24 Stunden alt. *Feulgen*-Färbung (Hydrolyse bei 40°). Vergr. 1710 mal.



Abb. 6. *Bacillus mycoides.* Kultur 5 Tage alt. *Feulgen*-Färbung (Hydrolyse bei 40°). Vergr 1710 mal.

Die gleichen zytologischen Ergebnisse wurden ferner bei *Bac. mesentericus fuscus*, *Bac. mycoides*, *Bac. Ellenbachensis*, *Bac. robur* und *Bac. ruminatus* erzielt.

Bei *Bac. mycoides* sind im Plasma stets Fetttröpfchen nachweisbar. Diese Fettbildung kann schließlich so weit gehen, daß die Zelle dadurch weitgehend vakuolisiert wird. Unterzieht man diese Zellen der Nuclealreaktion nach Hydrolyse bei zu hohen Temperaturen (s. Hydrolysewirkung S. 141), so ist das gesamte Plasma, mit Ausnahme der Fetttröpfchen diffus gefärbt. Dadurch kann der Eindruck erweckt werden, es sei ein netzartiger „Kern" vorhanden. Nach einer Hydrolyse bei 40° dagegen konnten nuclealpositive Körnchen festgestellt werden, und zwar in jungen wie in sporulierenden Zellen. Die Anordnung der Körnchen und ihre Beziehung zur Zellteilung und Sporenbildung ist die gleiche wie bei den früher beschriebenen Bakterienarten.

Endlich soll noch kurz erwähnt werden, daß auch bei *Sarcinen* die Nuclealsubstanz sich auf bestimmte Strukturen beschränkt. Jede Einzelkokke des paketähnlichen Zellverbandes enthält im Innern einen kleinen nuclealpositiven Bezirk; das übrige Plasma gibt keine Nuclealreaktion. Auch bei *Azotobacter* waren distinkte nuclealpositive Körnchen zu beobachten, deren Verhalten aber nicht näher verfolgt wurde.

Einfluß der Hydrolysebedingungen auf den Ausfall der Nuclealreaktion.

Besondere Beachtung wurde der Frage geschenkt, ob sich im *Feulgen*-Präparat bei Variation der Temperatur und Hydrolysedauer Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der nuclealpositiven Substanz feststellen lassen. Es sollte also ermittelt werden, ob eine diffuse Anfärbung der Zelle *bei tatsächlich vorhandenem Zellkern* möglicherweise als Kunstprodukt herbeigeführt werden kann.

Aus diesem Grunde wurde zunächst als größeres kernhaltiges Vergleichsobjekt die Epidermis der Zwiebel von *Allium cepa* gewählt.

Die Zellen haben folgende Dimensionen: Breite 50 bis 60 μ, Länge 150 bis 200 μ, Zellkern 15 μ.

Die Gewebestücke wurden in Sublimatalkohol fixiert und darauf 48 Stunden der Dimedon-Alkoholbehandlung ausgesetzt. Die Hydrolyse erfolgte bei 60, 80 und 95° C; dabei wurde die Dauer ebenfalls variiert, und zwar im Sinne des *van't Hoff*schen Gesetzes (= Reaktionsbeschleunigung bei einer Temperatursteigerung von 10° auf das Zwei- bis Dreifache). Sie betrug für die drei Parallelen 12, 3 bzw. 1 Minute.

Die Nuclealreaktion fiel bei den einzelnen Gewebestücken nicht gleichmäßig aus, sondern sie zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Temperatur der Hydrolyse.

In dem bei 60° hydrolysierten Gewebe waren die Kerne intensiv violett gefärbt; innerhalb der Kerne zeigten die Nucleolen keine Nuclealreaktion. Ebenso blieb das gesamte Zytoplasma völlig ungefärbt.

Nach einer Hydrolyse bei 80° erschienen im Kern auch die Nucleolen gefärbt. Außerdem zeigte auch das Zytoplasma eine schwache Violettfärbung.

Nach einer Hydrolyse bei 95⁰ endlich war die nuclealpositive Substanz auf die gesamte Zelle verteilt. Der Zellkern — der auch im ungefärbten Zustande gut sichtbar ist — unterschied sich vom Zytoplasma nicht mehr durch stärkere Anfärbung.

Die gleichen Ergebnisse ließen sich auch in den Zellen der Blumenkronblätter von *Amaryllis* und *Bellis perennis* bei Variation der Temperatur der Hydrolyse feststellen.

Anschließend wurden *Hefe*arten (*Burgunderhefe, Bäckerhefe*) in gleicher Weise unter veränderten Hydrolysebedingungen untersucht.

In diesem Zusammenhang sei zunächst auf Ergebnisse hingewiesen, die *Imšenecki* bei vier verschiedenen *Hefe*arten bei Anwendung der *Feulgen*schen Nuclealreaktion erzielte. Er fand bei größeren Anhäufungen nach einer Hydrolyse bei 60⁰ makroskopisch positive Nuclealreaktion, konnte aber bei mikroskopischer Betrachtung in keinem Falle in den Zellen gefärbte Kerne beobachten. Infolgedessen wurde die Dauer der Hydrolyse (15 Minuten) und die Temperatur (75⁰) gesteigert; auch hierdurch wurde der Kern nicht sichtbar. *Imšenecki* schließt aus diesem Verhalten, daß nicht die Methodik der Nuclealreaktion, sondern der Bestand der untersuchten Objekte für diesen negativen Ausfall verantwortlich sei. Die Hefekerne gäben infolge ihres geringen Umfanges eine so schwache Reaktion, daß die Anfärbung erst bei größeren Zellanhäufungen, nicht aber in der einzelnen Zelle sichtbar sei.

In den eigenen Untersuchungen an *Hefen* ließ sich nach einer Hydrolysetemperatur von 60⁰ (10 Minuten) sehr oft eine deutliche Anfärbung des Kernes erzielen. Erfolgte die Hydrolyse dagegen bei 70⁰ und höheren Temperaturen, dann ergab die gesamte Zelle eine diffuse Nuclealreaktion. Endlich wurde die Hydrolyse noch im Autoklaven bei 132⁰ ausgeführt. Nach dieser Behandlung trat überhaupt keine Nuclealreaktion mehr ein. Vielmehr blieben die Zellen völlig ungefärbt. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß durch die Einwirkung der hohen Temperatur das reaktionsgebende Abbauprodukt der Thymonucleinsäure restlos zerstört ist. Daher ist schon aus diesem Grunde eine Flammenfixage — abgesehen von den strukturellen Veränderungen, die diese rohe Methode innerhalb der Zelle hervorrufen kann — für Nuclealpräparate ungeeignet.

Da bei einer Hydrolysetemperatur von 60⁰ die *Hefe*zellen bisweilen eine diffuse Nuclealreaktion zeigten, wurde schließlich noch eine größere Anzahl von Präparaten bei niedrigerer Temperatur, und zwar bei 40⁰, 1 Stunde lang hydrolysiert. Nach Einwirkung der fuchsinschwefligen Säure trat dann der Zellkern stets sehr klar gefärbt hervor, während das Zytoplasma völlig ungefärbt blieb.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für sämtliche untersuchten Bakterienarten, die ja erheblich kleinere Organismen darstellen als die eben beschriebenen Zellen, von der üblichen Hydrolysetemperatur, die 60⁰ beträgt, abgewichen und bei 40⁰ hydrolysiert. Die Dauer der Einwirkung wurde entsprechend heraufgesetzt. Sie betrug 60 Minuten.

Nach einer Hydrolyse bei 60° (8 bis 10 Minuten) zeigten die Bakterienzellen — und zwar konnte diese Feststellung bei allen untersuchten Arten gemacht werden — meistens eine diffuse Nuclealreaktion des gesamten Protoplasten. Nur gelegentlich konnte unter diesen Hydrolysebedingungen eine Lokalisation der nuclealpositiven Substanz in bestimmten Strukturen festgestellt werden.

Wurde dagegen das gleiche Material anstatt bei 60° bei 40° hydrolysiert, so war die Anzahl der Präparate, in denen sich die Nuclealreaktion auf bestimmte Strukturen innerhalb der Zelle beschränkte, erheblich größer.

Hieraus geht klar hervor, daß durch eine Hydrolyse bei 40° eine Diffusion der nuclealpositiven Substanz auf die gesamte Zelle verhindert werden kann, so daß durch die nachfolgende Nuclealreaktion Strukturen sichtbar werden, die nach einer Hydrolyse bei 60° nicht dargestellt werden können.

Es fragt sich nun, ob sich diese zytologischen Ergebnisse, die mit Hilfe der Nuclealreaktion gewonnen wurden, mit den bisher bekannten chemischen Eigenschaften der Thymonucleinsäure vereinbaren lassen.

Die genuine Thymonucleinsäure liegt in den Zellkernen als die gelatinierende hochkolloidale *a*-Form vor. Es handelt sich dabei um ein Polymeres des nichtkolloiden Tetranucleotids, das man als *b*-Form bezeichnet. Die polymere *a*-Form schließt adsorptiv eine variable Eiweißkomponente mit ein.

Durch Eingriffe verschiedener Art kann die *a*-Form in die *b*-Form überführt werden.

Im natürlichen Zustande, im Zellkern, erfolgt dieser Übergang nach *R. Feulgen* auf enzymatischem Wege, mittels der „Nucleogelase".

Künstlich kann eine Depolymerisierung der *a*-Thymonucleinsäure ebenfalls fermentativ, und zwar durch Pankreatinum absolutum, das Nucleogelase enthält, herbeigeführt werden (*Feulgen*).

Zellen der Epidermis von *Allium cepa*, *Hefe*zellen und *Bakterien*, die 48 Stunden lang der Einwirkung einer 1 %igen Lösung von Pankreatinum absolutum[1] bei einem p_H von 6,8 und einer Temperatur von 37° ausgesetzt waren, zeigten nach dieser Behandlung stets nur eine diffuse Nuclealreaktion, obgleich die Hydrolyse bei 40° durchgeführt war.

Ebenso wird durch Erwärmen mit Natronlauge, mit Salzlösungen und selbst mit Wasser eine Depolymerisierung der *a*-Thymonucleinsäure herbeigeführt. Erhitzen der trockenen Substanz wirkt im gleichen Sinne. Bei allen Versuchen, die Thymonucleinsäure aus dem Organismus

[1] Pankreatinum absolutum der Firma *Merck* in Darmstadt. — Der Enzymlösung waren einige Tropfen Toluol zugesetzt, um eine Infektion durch Bakterien zu verhindern.

zu isolieren, ist eine Desaggregierung der *a*-Form in die *b*-Form nicht zu verhindern.

Durch die Salzsäurehydrolyse werden von der Thymonucleinsäure, die aus vier Mononucleotiden (Ribodesoseguanylsäure, Ribodesoseadenylsäure, Ribodesosecytidylsäure, Thyminsäure) aufgebaut ist, Guanin und Adenin abgespalten und die Ribodesosen freigemacht, die mit der fuchsinschwefligen Säure positiv reagieren. Durch die Hydrolyse schlechthin braucht die Thymonucleinsäure nicht aus ihrer Eiweißbindung, also aus ihrer kolloidalen Form, freigelegt zu werden; vielmehr dürfte lediglich die Wärmewirkung die Depolymerisierung bewirken und eine Diffusion der nuclealpositiven Substanz aus ihrer ursprünglichen strukturellen Bindung auf die gesamte Zelle herbeiführen.

Es ließe sich einwenden: wenn nach einer Hydrolyse bei 60° die Zellkerne in pflanzlichen und tierischen Geweben durch die Nuclealreaktion einwandfrei nachweisbar sind, so müßte das für die Bakterien, falls dort die Thymonucleinsäure an morphologisch differenzierte Zellbestandteile gebunden ist, unter gleichen Hydrolysebedingungen ebenfalls möglich sein.

Dieser Einwand ist jedoch nicht haltbar, denn zweifellos sind die Größenunterschiede, die zwischen den Zellkernen höherer Organismen und den in den Bakterien beobachteten Körnchen bestehen, von entscheidender Bedeutung für die Diffusion der nuclealpositiven Substanz.

Bei Gegenüberstellung der Größenverhältnisse des Zellkernes der Epidermis von *Allium cepa*, dessen Durchmesser 15 μ beträgt, und eines 0,3 μ großen nuclealpositiven Körnchens der Bakterienzelle, ergeben sich, als Kugel berechnet, folgende relativen Werte:

Die Durchmesser verhalten sich wie 50 : 1, die *Oberflächen* daher wie 31430 : 12,58 = 2500 : 1 und die *Volumina* wie 523700 : 4,19 = 125000 : 1.

Aufs Volumen bezogen hat also das nuclealpositive Körnchen eine 50mal größere relative Oberfläche als der Zellkern von *Allium cepa*, eine Tatsache, die für die größere Labilität des Körnchens von besonderer Wichtigkeit ist.

Verhalten der nuclealpositiven Substanz der Bakterien bei Kultur unter extremen Lebensbedingungen.

In den folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob die Menge der nuclealpositiven Substanz und ihre Lokalisation innerhalb der Zelle in irgendeiner Weise von der Beschaffenheit des Nährbodens abhängig und durch Kultur der Bakterien unter extremen Lebensbedingungen zu beeinflussen ist.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß nach *Pokrowskaja* bei *Bac. pestis* bei saprophytischer Lebensweise eine Entmischung der Thymonucleinsäure zu einem „echten Kern" eintreten soll, während die Zelle bei parasitischer Lebensweise eine diffuse Nuclealreaktion zeige.

Nach *Pietschmann* und *Rippel* soll Einwirkung von Magnesiumsulfat und von Lithiumchlorid bei *Bac. mycoides* Reizformen herbeiführen, die eine lokalisierte Nuclealreaktion zeigen. Die entmischten Formen hätten ihre Vermehrungsfähigkeit eingebüßt.

Es war daher notwendig, die Zusammensetzung des Nährbodens in mehrfacher Hinsicht innerhalb weiter Grenzen zu variieren, um so zu entscheiden, ob die nuclealpositiven Strukturen als transitorische Gebilde — im Sinne eines Reservestoffes — oder vielleicht als gelegentlich auftretende Entmischungserscheinungen oder aber als umweltstabile und kontinuierliche Zellbestandteile anzusprechen sind.

Daher wurde im Nährboden die Menge an organischen Nährstoffen, der Salzgehalt und die Wasserstoffionenkonzentration variiert.

1. Variation der organischen Nährstoffe.

Das Verhalten von *Bac. subtilis* wurde auf folgenden 12 verschiedenen Nährböden verfolgt, die sich durch ihren Gehalt an Dextrose bzw. Pepton + Fleischextrakt voneinander unterschieden:

Nährboden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dextrose . . .	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1
Pepton	12,0	5,0	1,2	0,1	12.0	5,0	1,2	0,1	12,0	5,0	1,2	0,1
Fleischextrakt .	2,5	1,5	0,5	0,1	2,5	1,5	0,5	0,1	2,5	1.5	0,5	0,1

K_2HPO_4 0,5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 g, NaCl 0,2 g, Agar 1,5 g, Aqua dest. zu 100 ccm; neutrale Reaktion. Die Kultur erfolgte in *Petri*-Schalen im Brutschrank bei 25°.

In sämtlichen Platten stellte sich bald — allerdings verschieden starkes — Wachstum ein. Vor allem die Wuchsform der einzelnen Kulturen ließ deutlich eine Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Nährbodens erkennen.

Auffallend spärlich breitete sich der Bazillus auf den sehr peptonreichen Nährböden (12% Pepton) aus. Dort bildeten sich kleine, dem Substrat dickaufliegende feste Kolonien. Bei den Plattenkulturen, die neben dem hohen Peptongehalt gleichzeitig noch 1,5% Dextrose enthielten, war die Entwicklung bereits nach 24 Stunden völlig zum Stillstand gekommen und keine Größenzunahme der Kolonien mehr festzustellen. Dieses kümmerliche Wachstum ist darauf zurückzuführen, daß die hohe Pepton- und Dextrosekonzentration den Dampfdruck des Substrates erniedrigt, gleichzeitig den osmotischen Druck steigert und somit der Ausbreitung der Bakterien entgegenwirkt.

Schwaches Wachstum stellte sich ferner auf den nährstoffarmen Böden (Pepton 0,1% + Dextrose 0,1 bzw. 0,5%) ein; dort bildeten sich nur sehr winzige dünne Kolonien. Auf allen übrigen Nährböden dagegen kam es zu üppiger Entwicklung, so daß bald die ganze Oberfläche des Substrates von einer dichten Bakterienmasse bedeckt war.

Auch die Form der Stäbchen war in den einzelnen Plattenkulturen recht verschieden. Auf den dextrosereichen Böden entwickelten sich lange

schlanke Stäbchen, während bei den niedrigeren Dextrosekonzentrationen kurze Zellen auftraten.

Zur zytologischen Untersuchung wurden in bestimmten Zeitabständen von sämtlichen Plattenkulturen Nuclealpräparate hergestellt und miteinander verglichen.

Mikroskopisch zeigten die Nuclealpräparate, die den einzelnen Kulturen entstammten, die bereits erwähnten Verschiedenheiten hinsichtlich der Zellform der Bakterien. In bezug auf die Lokalisation der nuclealpositiven Substanz stellte sich bei allen Parallelen die größte Übereinstimmung heraus. Sowohl in Ausstrichen von sehr jungem wie von altem Material konnte festgestellt werden, daß der reaktionsgebende Stoff an bestimmte Strukturen gebunden ist, deren Größe, Anzahl und Anordnung innerhalb der Zelle durch den Nährstoffgehalt des Substrates nicht zu beeinflussen ist. Es kann sich daher bei den nuclealgefärbten Gebilden nicht um irgendeinen Reservestoff „unbekannter Natur“ handeln.

Zur Kontrolle wurde diese Versuchsreihe auf verschiedenen Nährböden auch mit *Bac. mesentericus fuscus* und *Bac. megaterium* durchgeführt. Auch hierbei erwies sich die Stabilität der nuclealpositiven Gebilde gegenüber dem Gehalt des Nährbodens an organischen Nährstoffen.

2. Gehalt des Nährbodens an Salzen.

Anschließend wurde auch die Konzentration der Salze im Nährboden variiert. Einem Peptonnährboden (1,5 % Pepton + 0,05 % $MgSO_4$ + 0,1 % NaCl) wurden Phosphatgaben (K_2HPO_4) von 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 und 1 % zugesetzt.

In einem Parallelversuch wurde statt des Kaliumphosphates die Konzentration des Magnesiumsulfates (0,01, 0,05 und 0,2 %) variiert.

Als Versuchsobjekt diente *Bac. subtilis*. Die verschiedenen Salzkonzentrationen riefen keinen Unterschied in dem Ausfall der Nuclealreaktion hervor; die von den verschiedenen Nährböden entnommenen Ausstriche zeigten völlige Übereinstimmung.

3. Wasserstoffionenkonzentration des Substrates.

In weiteren Versuchen sollte festgestellt werden, ob die Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens irgendeinen feststellbaren Einfluß auf den kolloidalen Zustand der Thymonucleinsäure *innerhalb* der Bakterienzelle und somit auf die Stabilität der nuclealpositiven Gebilde ausübt.

Daher wurden Nährlösungen von verschiedenem p_H angesetzt. Zunächst wurden Standardlösungen von $^1/_{15}$ mol. primärem Kaliumphosphat (nach *Sörensen*) und $^1/_{15}$ mol. sekundärem Natriumphosphat[1] in wechselndem

[1] 9,078 g KH_2PO_4 bzw. 11,876 g Na_2HPO_4 in 1 Liter wässeriger Lösung.

Verhältnis gemischt und je 10 ccm dieser Puffermischungen, die sich durch ihre Wasserstoffionenkonzentration unterschieden, auf 100-ccm-*Erlenmeyer*-Kolben in folgender Weise verteilt:

Kölbchen	ccm sekundäres Phosphat	ccm primäres Phosphat	p_H	Kölbchen	ccm sekundäres Phosphat	ccm primäres Phosphat	p_H
1	9,90	0,10	8,68	4	5,00	5,00	6,81
2	9,00	1,00	7,73	5	2,00	8,00	6,24
3	7,00	3,00	7,17	6	0,25	9,75	5,29

Dann wurden jedem Kolben 10 ccm einer lackmusneutralen Nährlösung von: Pepton *Witte* 2,4 %, *Liebigs* Fleischextrakt 1,2 %, NaCl 0,3 %, zugesetzt. Nach dem Sterilisieren wurde die Versuchsreihe (zwei Parallelen) mit Sporen von *Bac. subtilis*, die einer 100 Tage alten Kultur entstammten, beimpft und bei 25° bebrütet.

Während in Kölbchen 1, das ziemlich alkalische Nährlösung enthielt, keine Entwicklung einsetzte, trat in den übrigen Kulturen bald Wachstum ein. Am üppigsten entwickelten sich die Bakterien in den physiologisch *sauren* Nährlösungen 4, 5 und 6; dort bildete sich schließlich eine feste Kahmhaut an der Oberfläche der Flüssigkeit, während sich in Kölbchen 3 eine zähe schleimige Bakterienmasse entwickelte. In Nährlösung 2 dagegen verursachten die Bakterien eine gleichmäßige milchige Trübung.

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden von sämtlichen Kulturen in bestimmten Zeitabständen (10, 15, 24, 36 Stunden) Ausstriche hergestellt und nuclealgefärbt. Dabei ließen sich keine zytologischen Unterschiede bei Ausstrichen gleichen Alters feststellen; die in alkalischer wie die in saurer Nährlösung gewachsenen Bakterien zeigten in gleicher Weise die nuclealgefärbten Strukturen, über deren Anordnung innerhalb der Zelle bereits im Vorhergehenden berichtet ist.

Eine weitere Versuchsreihe unter gleichen Bedingungen mit *Bac. mesentericus fuscus* führte ebenfalls zu der Feststellung, daß auch bei diesem Bazillus die nuclealgefärbten Strukturen nicht durch die Wasserstoffionenkonzentration des Substrates zu beeinflussen sind.

Die *Temperatur*, bei der die Bakterien gewachsen sind, übt ebenfalls keinen Einfluß auf Menge und Lokalisation der nuclealpositiven Substanz aus, wie bei Kultur unter extremen Bedingungen (10 bis 37° C) festgestellt werden konnte.

Auch die Einwirkung von *Tageslicht* auf die Kulturen spielt für den Ausfall der Nuclealreaktion keine Rolle.

Rückblick.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß in der Bakterienzelle in allen Entwicklungsstadien die positive *Feulgen*-Reaktion gebende Substanz nicht wahllos auf das gesamte Plasma verteilt, sondern an

morphologisch differenzierte Gebilde gebunden ist. Diese Gebilde sind bei Kultur der Bakterien unter extremen Lebensbedingungen in ihrer Zahl und Anordnung innerhalb der Zelle nicht zu beeinflussen: sie scheinen also kontinuierliche Zellbestandteile zu sein. Auffallend ist vor allem ihr gesetzmäßiges Verhalten bei der Zellteilung und bei der Sporenbildung. Alle diese Beobachtungen würden für die Kernnatur dieser Körnchen sprechen oder dieser Auffassung zum mindesten nicht widersprechen.

Indessen ist nicht zu verkennen, daß wesentliche Kriterien, die bei höheren Organismen die Kernnatur sicherstellen (Aufteilung in Chromosomen usw.) bei unseren Mikroorganismen fehlen bzw. nicht beobachtet werden können. Zudem können sekundäre Erscheinungen hinzukommen, wie es etwa beim Festhalten des Fuchsins durch Membranen der Fall ist (*Feulgen*); bei der Kleinheit unserer Objekte ist es aber kaum möglich, eine sichere Entscheidung über den Farbton zu treffen und gegebenenfalls daran die erwähnte Erscheinung zu erkennen. Endlich wissen wir auch nicht, ob nicht noch andere Stoffe bei der Hydrolyse Aldehyde abspalten und die *Feulgen*-Reaktion vortäuschen. Gerade das Vorkommen zahlreicher Stoffe bei Mikroorganismen, die sich bei höheren Pflanzen nicht finden, muß in dieser Hinsicht zu einiger Vorsicht mahnen[1].

Was nun das diffuse Auftreten der *Feulgen*-Reaktion betrifft, so deuten meine Untersuchungen darauf hin, daß es sich um ein Kunstprodukt handeln könnte, das man durch Hydrolyse bei höherer Temperatur nicht nur bei unseren Objekten, sondern auch bei *Hefen* und höheren Pflanzen erzielen kann. Auch hier sind indessen sekundäre Erscheinungen infolge des tiefergehenden Eingriffes nicht ganz ausgeschlossen. Insbesondere war es mir nicht möglich, bei den Bakterien genau festzustellen, ob tatsächlich ein Abfließen der nuclealpositiven Substanz aus den „Kernen“ in das Zytoplasma stattfindet, sondern die Erscheinung konnte lediglich im Endeffekt festgestellt werden.

Aus all diesen Gründen, die im einzelnen hier nicht weiter auseinandergesetzt zu werden brauchen, da es sich um eine Reihe zwar möglicher aber unbekannter Faktoren handelt, ist die vorliegende Darstellung in erster Linie als Sammlung von Tatsachenmaterial aufzufassen. Ein endgültiges Urteil darüber, ob es sich bei den beobachteten Gebilden tatsächlich um Kerne handelt, wird sich erst dann abgeben lassen, wenn einerseits noch weitere Objekte herangezogen,

[1] Hinsichtlich der Arbeit von *Milovidov* vgl. man die Anmerkung [1] S. 126.

andererseits noch weitere Kriterien für eine Kernnatur beigebracht werden, und endlich mögliche Fehlerquellen genauer erkannt werden können.

Zusammenfassung.

1. Sämtliche untersuchten Bakterienarten — außer dem *Bacillus* der *Megaterium*-Gruppe: *Bac. megaterium*, *Bac. mesentericus fuscus*, *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Bac. Ellenbachensis*, *Bac. robur*, *Bac. ruminatus*, *Sarcinen*, *Azotobacter* — geben in jedem Entwicklungsstadium nach vorheriger Hydrolyse eine positive Nuclealreaktion. Ohne Hydrolyse tritt (nach Dimedon-Alkoholbehandlung) keine Reaktion ein.

2. Was die Lokalisation der Nuclealsubstanz anbetrifft, so kann man sowohl diffus angefärbte Zellen, als auch Zellen beobachten, in denen die Nuclealreaktion auf ganz bestimmte Strukturen innerhalb des Plasmas beschränkt ist.

3. Die diffuse Anfärbung der gesamten Zelle kann als Kunstprodukt durch die Einwirkung der Hydrolyse (bei einer Temperatur von 60°) herbeigeführt werden. Hydrolysiert man bei niedrigeren Temperaturen (40°), so läßt sich die Diffusion der nuclealpositiven Substanz auf die gesamte Zelle aus ihrer ursprünglichen strukturellen Bindung verhindern.

4. Es konnte festgestellt werden, daß die nuclealpositiven Strukturen nicht als Sporenanlagen, als Reservestoffe (Nährbodenvariation), als Entmischungserscheinungen (infolge von Reizwirkung) und auch nicht als Plasmolyseerscheinungen aufzufassen sind.

5. Zahl und Anordnung der nuclealpositiven Strukturen innerhalb der Zelle zeigen bei den sporenbildenden Bakterien eine gesetzmäßige Beziehung zur Zellteilung und zur Sporenbildung. Die Sporen enthalten *ein* nuclealpositives Körnchen, die vegetativen Stäbchen, und zwar schon die jüngsten Stadien, zwei bis vier Körnchen. Sobald sich die vegetativen Zellen im „Vierkörnchenstadium" befinden, erfolgt Zellteilung; dadurch ist das „Zweikörnchenstadium" wieder hergestellt. Die Körnchenteilung geht der Zellteilung stets um eine Generation voraus. Bei der Sporenbildung wird der Spore *ein* nuclealpositives Körnchen mitgegeben. Das zweite Körnchen, das sich gleichzeitig in der Mutterzelle befindet, geht nach dem Freiwerden der Spore mit dem Mutterzellrest zugrunde.

6. Da die nuclealpositiven Körnchen allem Anscheine nach kontinuierliche Zellbestandteile sind, die ein gesetzmäßiges Verhalten bei der Zellteilung und bei der Sporenbildung zeigen, so spricht vieles für ihre Kernnatur. Es kommen jedoch eine ganze Reihe von Möglichkeiten hinzu, die zu Vorsicht in der Deutung mahnen und jedenfalls eine endgültige Entscheidung noch nicht ermöglichen.

Literatur.

T. Casparsson, Skand. Arch. f. Physiol. **78**, Supplem. Nr. 8, 145 S., 1936, ref. Chem. Centralbl. **2**, 2929, 1936. — *A. da Cunha* u. *J. Muniz*, C. r. Soc. Biol. Paris **100**, 951, 1929. — *R. Feulgen* u. *H. Rossenbeck*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **185**, 203, 1924. — *R. Feulgen*, Die Nuclealfärbung, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. V, **2**, 1055—1073, 1926. — *Derselbe*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **238**, 105, 1936. — *A. Imšenecki*, diese Zeitschr. **5**, 451—476, 1934. — *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **94**, 330—336, 1936. — *A. Kiesel*, Chemie des Protoplasmas, Protoplasma-Monographien 4, 1930, Berlin (Borntraeger). — *J. Kuželа*, Zakonitoski zivota, Prag 1930, S. 199, ref. Centralbl. f. Bakt. I, Ref. **102**, 133, 1931. — *G. Klein*, Handb. d. Pflanzenanalyse. Spezielle Analyse, 3. Teil, S. 433ff. — *A. Meyer*, Die Zelle der Bakterien, Jena, Fischer, 1912. — *P. F. Milovidov*, diese Zeitschr. **6**, 475—509, 1935. — *Derselbe*, Dissertation. Prag 1936 (russisch). — *K. Pietschmann*, diese Zeitschr. **2**, 310—332, 1931. — *K. Pietschmann* u. *A. Rippel*, ebenda **3**, 422—452, 1932. — *M. Prokowskaja*, Centralbl. f. Bakt. I, **119**, 335, 1931. — *C. Stapp* u. *H. Bortels*, Zeitschr. f. Parasitenkde. **4**, 101—125, 1931. — *G. Tischler*, Allgemeine Pflanzenkaryologie. In *Linsbauers* Handb. d. Pflanzenanatomie, I. Abt., 1. Teil, 2, 1921/22. — *K. Voit*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **47**, 183, 1924; **55**, 564, 1925.

(Department of Bacteriology Iowa State College, Ames.)

Carboligatic activity of Escherichia coli[1].

By

H. Reynolds and C. H. Werkman.

(Eingegangen am 17. März 1937.)

The formation of acetylmethylcarbinol from glucose by bacteria of the genus *Aerobacter* has proved to be of distinct value in differentiating the genus from *Escherichia*. The reliability of the *Voges-Proskauer* test in differentiating the *colon* and *aerogenes* sections has never been questioned and it is of interest in connection with the work to be reported that organisms of the *coli* section which are regularly *Voges-Proskauer* negative are shown to possess the carboligatic mechanism which is responsible for the formation of acetylmethylcarbinol. However, under the usual conditions of culturing, the carboligase system does not function.

Certain organisms not forming the carbinol under normal conditions are known to do so in a properly adjusted environment. Thus, its formation by *yeasts* in a medium containing both glucose and acetaldehyde has been demonstrated by *Neuberg* and *Simon* (1925). *Kluyver* and *Donker* (1924) have reported the formation of acetylmethylcarbinol by *yeasts* and true *lactic acid bacteria* from glucose. These findings support the theory explaining formation of the carbinol by condensation of intermediately formed aldehyde. The exact conditions responsible for condensation of the aldehyde to acetylmethylcarbinol are not known. Usually the aldehyde is reduced to ethyl alcohol or oxidized to acetic acid. An organism may possess the carboligatic system and yet not form acetylmethylcarbinol because of an effective oxidizing or reducing action on the aldehyde; when this action is blocked the carboligase may have an opportunity to form acetylmethylcarbinol by condensation of aldehyde. The addition, for example, of a strong hydrogen acceptor may prevent reduction of the aldehyde to ethyl alcohol and favor its conversion to acetylmethylcarbinol.

In connection with results to be reported here, it will be interesting to note that *Kluyver* and *Donker* (1926) reported that *Escherichia coli*

[1] Supported by Industrial Science Research funds of Iowa State College.

in a suitably buffered medium converted intermediately formed acetaldehyde, in part, to acetylmethylcarbinol. In a later statement they observed that the former finding was based on one apparently successful result which they were subsequently unable to confirm (cf. *Ruchhoft et. al.* 1931, footnote, page 135).

Experimental.

While investigating the effect of oxygen on the dissimilation of glucose by *Esch. coli*, it was observed that neutral distillates from the fermentation liquor consistently gave strongly positive acetylmethylcarbinol reactions when tested according to the method of *O'Meara* (1931). The glucose-peptone medium had been buffered with sodium bicarbonate and inoculated with *Esch. coli number 26* of the American Type Culture Collection.

To determine whether the above results were dependent upon a fortuitous choice of culture, a number of other strains of *Esch. coli* were tested in the presence of oxygen. Fermentations were conducted in 2-liter flasks containing one liter of medium with 2.0 % glucose, 0.1 % dibasic potassium phosphate, and 2.0 % sodium bicarbonate. Details for preparing the bicarbonate glucose medium have been described previously (*Reynolds* and *Werkman*, 1937). Flasks for aeration were provided with a tube the lower end of which was fitted tightly into a small (one inch square) basswood block. The air forced through the pores of the block, entered the fermenting medium as a fine spray providing efficient aeration. Anaerobic and aerated fermentations were conducted in duplicate; samples were withdrawn at 24 hour intervals and tested for acetylmethylcarbinol by *O'Meara's* method. Tests were made both on the medium and on the first 10 ccm of distillate obtained from 100 ccm of medium. *Esch. coli* cultures *number 4163, 4265, 4348, 4349, 4656,* and *4692* of the American Type Culture Collection were used. Incubation was at 37° C. All cultures were examined for purity microscopically and by plating before and after completion of fermentation.

In 48 hours all of the aerated fermentations yielded distillates giving definitely positive *Voges-Proskauer* reactions. The same test on the fermented liquor was negative. During succeeding days, *Voges-Proskauer* tests on the distillates became increasingly strong. At the end of six days the concentration of acetylmethylcarbinol in the six aerated fermentations was sufficiently high to give distinctly positive tests on the liquor without distilling. The anaerobic controls were uniformly negative.

Portions of liquor from the aerated flasks, oxidized with ferric chloride and distilled into a buffered mixture of nickel chloride and hydroxylamine hydrochloride according to the method of *van Niel* (1927) gave red precipitates of nickel dimethylglyoximate.

Evidence indicates that organisms forming acetylmethylcarbinol can generally reduce it to 2, 3-butylene glycol.

Data have been presented by *Walpole* (1911) and by *Reynolds* and *Werkman* (1937) indicating that the carbinol is a precursor of the glycol. *Neuberg* and *Kobel* (1925) and *Nagelschmidt* (1927) have demonstrated the reduction of acetylmethylcarbinol by fermenting *yeasts*, *Hammer et. al.* (1935) its reduction by citric acid fermenting *streptococci*.

Pain (1926) and *Williams* and *Morrow* (1928) have reported the destruction of acetylmethylcarbinol by certain members of the methyl-red positive section of the *colon-aerogenes* group. The latter investigators concluded that the carbinol served as an accessory source of carbon. In view of the previous discussion it appeared probable that this disappearance of the carbinol was due to its reduction to 2, 3-butylene glycol and not to its use as a source of carbon.

Media containing acetylmethylcarbinol and glucose were fermented by *Esch. coli*, culture *26*. After incubating six days at 37° C. complete analyses were made of the fermented liquors. Fermentations were conducted anaerobically in one liter flasks containing one liter of medium. For details of technique see *Reynolds* and *Werkman* (1937). The 2, 3-butylene glycol was identified as described by *Kluyver*, *Donker* and *Visser 't Hooft* (1925). Typical results are shown in Table 1, p. 152. Glucose and acetylmethylcarbinol fermented and products formed are reported as millimoles per liter.

The results confirm the previously reported ability of *Esch. coli* to cause the disappearance of acetylmethylcarbinol in the presence of a sugar fermentation. Since the utilized carbinol is accounted for as 2, 3-butylene glycol, it is apparent that disappearance of the carbinol is the result of its reduction rather than utilization as a source of carbon. Though only a small portion of the available carbinol was reduced, considerable quantities of gaseous hydrogen were evolved. It is of interest that in the presence of added carbinol, less hydrogen was evolved than with the control (glucose alone), but decreases in hydrogen were accompanied by similar decreases in carbon dioxide so that in all three fermentations, the two gases appeared in approximately equivalent molar quantities. Apparently the hydrogen resulting from the decarboxylation of formic acid is not activated for reduction of acetylmethylcarbinol under these conditions.

The most significant change in ratio in the presence of added acetylmethylcarbinol is that of ethyl alcohol to acetic acid. From the fermentation of glucose alone, ethyl alcohol is formed in somewhat greater quantity than acetic acid. The converse was true in the presence of carbinol. The results indicate that the same source of hydrogen

Table I. The fermentation of glucose by *Escherichia coli* in the presence of acetylmethylcarbinol[1].

Acetyl-methyl-carbinol	Glucose fermented	Acetyl-methyl-carbinol fermented	Carbon dioxide	Hydrogen	Formic acid	Ethyl-alcohol	Acetic acid	Succinic acid	Lactic acid	2, 3-Butylene glycol	Per cent recovery of carbon	Redox-index*
0.0 %	73.0	0	41.2	39.2	4.25	27.0	22.05	3.56	87	0	95.4	0.948
0.5 %	75.4	15.0	32.1	34.2	3.32	18.0	22.38	8.98	101	13.0	99.0	0.97
1.0 %	70.2	18.4	27.4	28.8	2.96	14.6	18.24	7.03	101.8	12.88	97.3	1.05

* Cf. *Erb, Wood* and *Werkman*, J. Bact. **31**, 595, 1936; perfect index = 1.

acting to reduce intermediate acetaldehyde to ethyl alcohol is capable of reducing acetylmethylcarbinol to 2, 3-butylene glycol.

Summary.

The formation of acetylmethylcarbinol from glucose by *Esch. coli* in vigorously aerated media constitutes additional proof of the intermediate formation of acetaldehyde in that fermentation. Interference of an accessory hydrogen açceptor (oxygen) preventing immediate reduction of the aldehyde results in its accumulation and condensation. *Esch. coli* in common with many other organisms possesses the carboligase system.

In the presence of glucose, *Esch. coli* can reduce small quantities of acetylmethylcarbinol to 2, 3-butylene glycol.

References.

B. W. Hammer, G. L. Stahly, C. H. Werkman and *M. B. Michaelian*, Research Bulletin **191**, Iowa Agri. Expt. Sta., Iowa, 1935. — *A. J. Kluyver* and *H. J. L. Donker*, Proc. Acad. Sci. Amsterdam **28**, 314, 1924. — *A. J. Kluyver, H. J. L. Donker* and *F. Visser 't Hooft*, Biochem. Zeitschr. **161**, 361, 1925. — *A. J. Kluyver* and *H. J. L. Donker*. Chem. d. Zelle u. Gewebe **13**, 134, 1926. — *G. Nagelschmidt*, Biochem. Zeitschr. **186**, 317, 1927. — *C. Neuberg* and *E. Simon*, Biochem. Zeitschr. **156**, 374, 1925. — *C. Neuberg* and *M. Kobel*, ibid. **160**, 250, 1925. — *C. B. van Niel*, ibid. **187**, 472, 1927. — *R. A. O. O'Meara*, J. Path. Bact. **34**, 401, 1931. — *F. S. Paine*, J. Bact. **13**, 269, 1926. — *H. Reynolds* and *C. H. Werkman*, ibid., accepted, 1937. — *C. C. Ruchhoft, J. G. Kallas, B. Chinn* and *E. W. Culter*, ibid. **22**, 125, 1931. — *G. S. Walpole*, Proc. Roy. Soc. London B **83**, 272, 1911. — *O. B. Williams* and *M. B. Morrow*, J. Bact. **16**, 43, 1928.

[1] Medium: 2.0 % glucose, 0.5 % Bacto peptone, 1.0 % $CaCO_3$; quantities in millimoles per liter.

Zytologische und mikrochemische Untersuchungen an koprophilen Ascomyceten.

Von

Georg Schweizer, Hohenheim (Wttbg.).

Mit 15 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. April 1937.)

Vorliegende Abhandlung ist aus Notizen hervorgegangen, die ich seit Jahren für meine persönlichen Zwecke an Hand von mikroskopischen Untersuchungen, namentlich über die Entwicklungsgeschichte von koprophilen Pilzen, vorwiegend Ascomyceten, gesammelt habe. Es sind Fragen, die im Laufe der Zeit in Dissertationen und anderen Veröffentlichungen wohl immer wieder angeschnitten, doch bis jetzt, vielleicht auch infolge der Schwierigkeit der Objekte, nie ganz klar beantwortet wurden.

a) Querwandporen im Archikarp.

So ist die Frage nach dem Vorhandensein von Querwandporen in den Archikarpzellen von Ascomyceten vor der Kernwanderung in die ascogenen Hyphen wohl entschieden, dagegen ist der Zeitpunkt der Querwandporenentstehung noch strittig.

Man findet oft in der Literatur Angaben wie: „Die Querwände des Archikarps sind durchbrochen", seltener: „Jede Querwand ist von Anfang an von einem zentralen Porus durchbrochen", wie dies *Delitzsch* (7) vom Archikarp von *Lasiobolus pulcherrimus Crouan* sagt. Kurz, Querwandporen wurden in den Archikarpien der meisten Ascomyceten vorgefunden, die bis jetzt untersucht wurden (10, 23). Ich sagte eben: „in den Archikarpien der *meisten* Ascomyceten", denn in denjenigen Archikarpien, in denen bis jetzt keine Kernwanderung aus den Nachbarzellen in die ascogene Zelle festgestellt werden konnten, hatte man auch keine Querwandporen gefunden. Die bisher untersuchten Objekte bedürfen indessen der Nachprüfung, zumal auch von *Delitzsch* (7) später bei *Lasiobolus pulcherrimus* und *Humaria anceps* Querwandporen im Archikarp aufgefunden wurden, trotzdem nach ihm bei beiden Pilzen keine Kernwanderung aus den Nachbarzellen des Archikarps in die ascogene Zelle stattfindet. Nach *Dangeard* (6) und *Delitzsch* (7) aber bilden die Querwandporen im Archikarp von Ascomyceten keine spezifische Einrichtung für die Kernwanderung, sondern dienen wohl in erster Linie dem Stoffaustausch. Gerade die auseinandergehenden Befunde einiger Autoren, einerseits die Feststellung von Querwandporen, andererseits wieder die Nichtauffindung solcher im Archikarp ein und desselben Objekts, geben zu Bedenken Anlaß. Es liegt mir fern, etwa eine Polemik heraufbeschwören oder etwa die Verdienste des einen oder anderen Autors auf diesem Gebiete schmälern zu wollen. Ist doch schon das Sexualproblem bzw. der Kernphasenwechsel mit den dabei mitsprechenden Umständen bei den Ascomyceten innerhalb 25 Jahren mehr

oder weniger stark umstritten worden. In vorliegender Abhandlung näher auf das Sexualproblem selbst einzugehen, war auch von vornherein nicht meine Absicht.

Zu den oft stark voneinander abweichenden Untersuchungsergebnissen bei ein und demselben Objekt trägt, was ohne weiteres zugegeben werden muß, sein komplizierter Bau bei, der meistens ohne Herstellung von Mikrotomschnitten nicht eingehend untersucht werden kann, und der den Morphologen und Zytologen vor schwierige Aufgaben stellt. Aber das sollte gerade zu größter Zurückhaltung in der Deutung nicht ganz einwandfreier Präparate veranlassen und nicht zum starren Festhalten an Meinungen verleiten, die mit zuverlässig ermittelten Tatsachen nicht mehr in Einklang zu bringen sind. Die Feststellung von Querwandporen, sowohl in den Archikarpien als auch in den vegetativen Hyphen, erfordert eine scharfe Beobachtung. Die Unstimmigkeiten im Befund über das Vorhandensein von Querwandporen im Archikarp und in den Mycelfäden bei ein und demselben Pilz rühren meines Erachtens auch oft mit daher, daß in den meisten Fällen nicht das Stadium der ontogenetischen Entwicklung des Fruchtkörpers oder das Alter des Mycels angegeben wird, sondern daß einfach beispielsweise, wie oben bereits angedeutet, gesagt wird: „Die Querwände des Archikarps oder Ascogons und der vegetativen Hyphen sind durchbrochen.“ Zu dem Schluß, daß es notwendig ist, diese Angaben genauer zu fassen, kam ich auf Grund von Nachprüfungen mehrerer schon früher von verschiedener Seite untersuchter Ascomyceten. Es dreht sich hier meist um „apogame“, besser gesagt „apandrische“ Formen[1]. Es berührte mich nämlich immer etwas unangenehm, bis jetzt gewisse Befunde anderer Autoren nicht mit Bestimmtheit bestätigen zu können, namentlich solche, die sich auf die Querwandporen im Mycel und Archikarp beziehen. In erster Linie richtete sich aber das Mißtrauen gegen mich selbst und konnte nur durch Nachprüfung der mir strittig erscheinenden Objekte beseitigt werden. Im Verfolg der Untersuchungen mußte ich zu meinem Erstaunen oft feststellen, daß ich z. B. bei *Ascophanus carneus* (22) und anderen Pilzen das eine Mal, wenn auch nicht überall, Querwandporen in den vegetativen Hyphen vorfand, das andere Mal wieder überhaupt keine. Bestünden Querwandporen von Anfang an, also schon kurz nach der Sporenkeimung des Mycels, so müßte ich sie doch bei jeder mikroskopischen Mycelunterşuchung gefunden haben, was aber nicht der Fall war. Ähnliche Feststellungen konnte ich an den Archikarpien verschiedener anderer Ascomyceten machen, und ich will an erster Stelle diese Beobachtungen an Hand von Ergebnissen besprechen, welche die Nachuntersuchungen einiger Ascomyceten bis jetzt gezeitigt haben.

Schon 1923 habe ich (15) bei *Ascobolus citrinus nov. spec.*, einer apandrischen (apogamen) Form festgestellt, daß die Querwandporen im Archikarp — auf die Kernverhältnisse will ich hier und in der Folge nicht eingehen — erst nach völliger Ausbildung desselben zur sogenannten *Woronin*schen Hyphe entstehen. Für *Ascobolus furfuraceus Pers.* habe ich genau den Zeitpunkt angegeben, zu dem die Wand-

[1] *Kniep* hält den Ausdruck „apogam“, der häufig für diese Art von Pilzen angewendet wird, für eigentlich verkehrt. Es ist besser, den Ausdruck „apandrisch“ dafür zu setzen, denn die Karyogamie im Ascus ist ein „echter Sexualakt“.

durchbrechungen im Archikarp entstehen (18), nämlich sobald an der Basis der Archikarpien Hüllhyphen auszusprossen beginnen (18, Abb. 2 c). Auch habe ich seinerzeit gesagt, daß der Porenbildung eine linsen- oder diskusförmige Quellung der Querwandmitten vorangeht, die sich in frischen, unfixierten Objekten mit Korallinsoda leuchtend rot färbt, während die übrigen Zellmembranen ungefärbt bleiben. Auch auf die Blaufärbung dieser Quellstellen durch Jod habe ich aufmerksam gemacht. Die gleichen Beobachtungen konnte ich bei der Nachuntersuchung an den Archikarpien von *Ascobolus immersus Pers.* (14), *Ascophanus carneus* (4, 14) und *Humaria granulata Quél.* (2) sowie *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.* machen. Von letztgenanntem folgt hier eine Abbildung aus den Nachuntersuchungsergebnissen (Abb. 1).

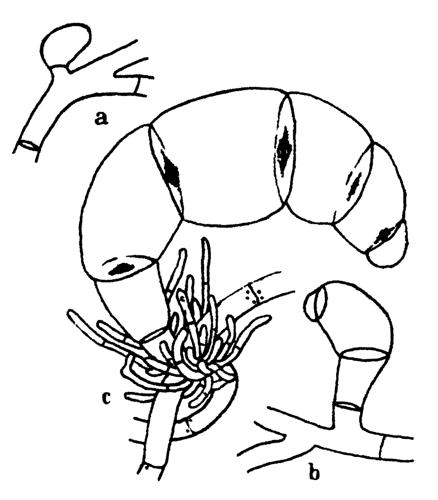


Abb. 1 *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.*
a) und b) Entwicklung des Archikarps aus vegetativen Hyphen.
c) Archikarp (sogen. *Woronin*sche Hyphe) vollständig entwickelt, aber noch ohne Querwanddurchbrechungen. Hüllhyphen erst im Entstehen begriffen. Vergr. 375 mal (Nähere Erklärung im Text.)

Beim Vergleich dieser Abbildung mit der von *Ascobolus furfuraceus* in einer früheren Arbeit (18, Abb. 1 u. 2, S. 17 u. 18) fällt ohne weiteres auf, daß die Archikarpbildung bei *Ascobolus citrinus* und *A. furfuraceus* auf die gleiche Weise vor sich geht. Es entstehen am Mycel knollenförmige Auswüchse (Abb. 1 a), die rasch zu gekrümmten Keulen heranwachsen, und in denen allmählich Querwände ausgebildet werden (Abb. 1 b). Die Querwände besitzen aber keine Wanddurchbrechungen, selbst nicht sofort nach vollständiger Ausbildung des Archikarps (Abb. 1 c), das bei beiden Pilzen eine sogenannte *Woronin*sche Hyphe darstellt. Die Archikarpien von *Ascophanus carneus* (4, 14), *A. immersus* (14) sowie von *Humaria granulata* (2) entstehen auf dieselbe Weise wie diejenigen von *Ascobolus furfuraceus* und *A. citrinus*, nämlich ebenfalls aus knollenförmigen Mycelauswüchsen, wenn auch nicht alle Archikarpien der genannten Pilze nach völliger Ausbildung gleichgestaltet sind und die typische *Woronin*sche Hyphe bilden. Da diese Archikarpienform genügend bekannt ist und vermutlich noch bei vielen bisher nicht untersuchten Ascomyceten aufzufinden sein wird, dürfte die Abb. 1 als Beispiel zur Orientierung genügen. Dagegen dürfte infolge der etwas abweichenden Form eine Abbildung über die Entwicklung des Archikarps von *Humaria granulata*

Quél. aus dem Mycel erwünscht sein (Abb. 2). Sie stimmt mit allen anderen in dieser Abhandlung besprochenen Ascomyceten überein, indem das Archikarp wieder aus knollenförmigen Mycelauswüchsen hervorgeht (Abb. 2a, 2b, 2c), und, wie wir im folgenden sehen werden, ihnen auch bezüglich der Querwandporenbildung gleicht. Parallel der allmählichen Ausbildung des Archikarps, das aus fünf bis sechs kurzen Zellen besteht, die nach dem Ende zu immer breiter werden (Abb. 2), geht auch die Querwandbildung in ihm vor sich. Ebenso ist es bei der Entwicklung des Archikarps von *Ascobolus furfuraceus* und *A. citrinus*. Die Endzelle des Archikarps von *Humaria granulata* ist groß und kugelig. Querwandporen sind bis zur völligen Ausbildung des Archikarps nicht vorhanden (Abb. 2a bis 2e). Sie entstehen auch wieder wie bei *Ascobolus furfuraceus* und *citrinus* zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt. Der Entstehung der Wanddurchbrechungen geht wieder eine Anschwellung

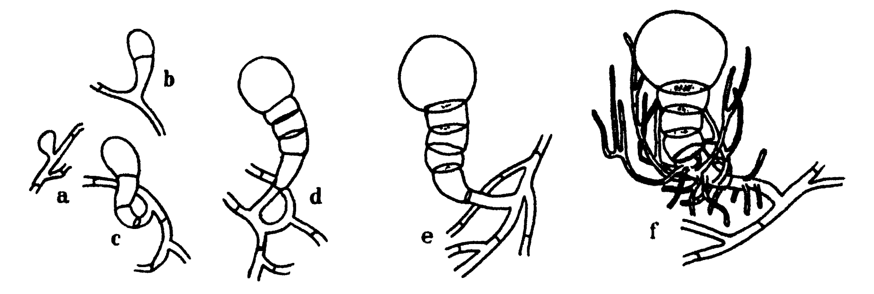


Abb. 2. *Humaria granulata Quél.*
a) bis f) Entwicklung des Archikarps aus dem Mycel.
f) Archikarp vollständig entwickelt, aber noch ohne Querwanddurchbrechungen, Hüllhyphen erst im Entstehen begriffen. Vergr. 260mal

der Querwandmitten im Archikarp voraus. Man kann den Beginn der Veränderung an den Querwänden schon bei Stadien beobachten, wie sie Abb. 2e wiedergibt. Hier werden die Querwände durch Jodjodkaliumlösung schwach blau gefärbt. Die Bläuung ist in der Mitte der Querwände besonders stark (in Abb. 2e durch leichte Punktierung angedeutet). Durch Korallinsoda werden die gequollenen Archikarpwände schwach gerötet.

Um diese Erscheinungen einwandfrei feststellen zu konnen, sind die Reaktionen an mehreren Objekten vorzunehmen. Es steht uns hier genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung, wenn wir, was die Kultur anbelangt, nach der Mullseidenmethode arbeiten (16).

Am deutlichsten treten diese Färbungen an Archikarpien hervor, bei denen schon die ersten Hüllhyphen zu erkennen sind, die bei *Humaria granulata* aus den beiden Basalzellen (Stielzellen) des Archikarps hervorsprossen (Abb. 2f). Die Korallinsoda- und Jodfärbung ist auf die Mitten der Querwände beschränkt. Auch sind die gefärbten Quer-

wandzentren linsenförmig aufgequollen (in Abb. 2f ebenfalls durch Punktierung angedeutet). Querwandporen sind aber noch nicht festzustellen. Sie werden erst allmählich gebildet, indem sich die gequollenen Membranstellen auflösen, und man kann die entstandenen Poren mitunter an Quetschpräparaten ganz junger Fruchtkörperchen, bei denen der Hüllhyphenmantel noch nicht vollständig ausgebildet ist, unmittelbar feststellen, in der Folge aber besser an Mikrotomschnitten. Zur Färbung der Zellwände eignet sich die Tannin-Eisenchloridmethode sehr gut (15). Auch die Membranimprägnation mit Silber, wie sie von *Delitzsch* (6) beschrieben ist, leistet gute Dienste zur leichteren Sichtbarmachung der Poren.

Vor einer Methode, so gut sie vielleicht für andere Zwecke ist, muß ich aber dringend warnen, nämlich davor, zwecks Feststellung von Querwandporen den Zellinhalt durch verdauende Fermente zu lösen, wie es *Delitzsch* (7) in bester Absicht getan und beschrieben hat. Während des Verlaufs meiner Untersuchungen hat sich ergeben, daß diese Methode, wie wir gleich sehen werden, unbedingt zu Trugschlüssen führen muß, auch wenn die Objekte vorher in Alkohol oder Formalin gehärtet wurden.

Die Bildung der Querwandporen scheint unter dem Einfluß zellwandlösender Fermente vor sich zu gehen, durch die zuerst die Wandungen in der Mitte eine chemische Veranderung und Quellung erfahren. (Daher vielleicht die intensive Blaufärbung der Querwandmitten mit Jod, die wir auch oft an der Spitze annähernd reifer Asci vieler Pilze feststellen können, an der Stelle, wo beim Abschleudern der Sporen ebenfalls eine Wanddurchbrechung durch Platzen der Membran oder auch durch Absprengen eines Deckels entsteht). In diesem Zustand sind die besprochenen, gequollenen Wandstellen schon durch peptische Fermente verdauungsfahig, wahrend die ubrigen Zellwände unangegriffen bleiben. Man findet also mittels der Verdauungsmethode in Archikarpien, die bezüglich des Entwicklungsstadiums etwa den Abb. 1c, 2e und 2f entsprechen, bei darauf folgender mikroskopischer Prüfung Wanddurchbrechungen, wo in der Tat noch keine vorhanden, sondern nur die Vorbedingungen zu ihrer Bildung gegeben sind (Quellung und chemische Veränderung der Membranmitten). Zum gleichen Befund gelangt man, wenn man die Verdauungsmethode zur Feststellung der Querwandporen im Mycel anwendet, worauf im folgenden noch näher eingegangen wird. Wir sehen also aus Vorhergehendem, daß bei *Ascobolus furfuraceus*, *A. citrinus* und *A. strobolinus* (17) sowie bei *Humaria granulata* die Querwandporen im Archikarp erst nach vollständiger Ausbildung der Archikarpien entstehen, und zwar etwa gleichzeitig mit der Ausbildung des Hüllhyphenmantels. Man kann also hier ganz bestimmt nicht sagen, daß die Querwandporen in den

Archikarpien „von Anfang" an vorhanden sind. Logischerweise müssen doch zuerst die Archikarpien und ihre Querwände alle vorhanden sein, bevor wir von deren Wanddurchbrechungen sprechen können; denn die Archikarpien und deren Querwände werden, wie wir verfolgen können, erst allmählich aus knollenförmigen Mycelauswüchsen gebildet, wenn auch die endgültige Form der Archikarpien nicht bei allen Pilzen dieser und verwandter Gattungen gleich ist. Es fragt sich nun, für welches Entwicklungsstadium des Archikarps von *Humaria anceps var. aurantiaca* z. B. *Delitzsch* (7), dessen Arbeiten ich teilweise die Anregung zu vorliegenden Untersuchungen verdanke, den Ausdruck: „Die Querwandporen sind von Anfang an vorhanden" geprägt hat. Meines Erachtens bezeichnet *Delitzsch* das der Form nach völlig ausgebildete Archikarp ohne Hüllhyphen als anfänglich! Er vergleicht auch in seinen Abbildungen (7, Abb. 15g u. 15h) die Archikarpien von *Humaria anceps var. aurantiaca* und *H. granulata* nach *Blackman-Frather* miteinander (Abb. 3), deren Entwicklung nach ihm völlig gleich ist. Nach Abb. 3 wäre aber die Archikarpbildung in bezug auf die

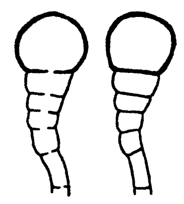


Abb. 3. Archikarpien
a) von *Humaria anceps var. aurantiaca*, *Delitzsch*.
b) von *H. granulata*, *Blackman-Frather*. Die Abbildungen sind der Arbeit von *Delitzsch* (7) entnommen. Vergrößerung 240mal. (Erklärung im Text.)

Querwandporenentstehung nicht gleich. *Delitzsch* (6) bildet das Archikarp von *Humaria anceps var. aurantiaca* mit ausgebildeten Querwandporen ab (Abb. 3a). Nach *Blackman* und *Frather* (2) sind in den Querwänden des Archikarps von *Humaria granulata* im gleichen Entwicklungsstadium keine Querwandporen vorhanden (Abb. 3b). Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen (siehe Abb. 2) ist die Abb. 3b richtig. Ob *Delitzsch* hier (Abb. 3a) in bester Absicht und zwecks genauerer Sichtbarmachung der Querwandporen die Verdauungsmethode angewendet hat, vermag ich nicht zu sagen. Sollte dies, was wohl anzunehmen ist, der Fall sein, so bekam er bei der nachträglichen Membranfärbung dort Querwandporen zu Gesicht, wo tatsächlich noch keine vorhanden, sondern nur die Vorbedingungen (Membranquellung) dazu gegeben waren. Der Fehler liegt also an der Methode, die, wie ich oben betonte, hier zweifellos zu Unklarheiten führen muß; sonst müßten die beiden in der Abb. 3 wiedergegebenen Archikarpien von *Humaria anceps* und *H. granulata*, was die Querwandporen betrifft, gleich sein, wie ja auch die Abb. 2 zeigt.

Einmal bildet *Delitzsch* (7) ein Archikarp von *Humaria anceps* ab und betont ausdrücklich, daß das Plasma vor der Membranfärbung

verdaut wurde. Gerade diesen Fall hier nochmals bildlich (Abb. 4) zu wiederholen, trägt sicher zur weiteren Aufklärung bei. *Delitzsch* (7) sagt an einer Stelle: „Die Entwicklung von *Humaria anceps var. aurantiaca* stimmt völlig überein mit der von *H. granulata,* wie sie 1906 von *Blackman* und *Frather* beschrieben wurde. ‚Neu' fand ich, daß auch hier von Anfang an jede Querwand im Archikarp (wie in den vegetativen Hyphen) von einem zentralen Porus durchbrochen ist (Abb. 7) usw." [Abb. 4 ist in der Arbeit von *Delitzsch* (7) mit Fig. 7 bezeichnet.] Das Material, an dem Querwandporen festgestellt wurden, war also, worauf in der Abb. 4 (bei *Delitzsch* Fig. 7) direkt hingewiesen ist, mit Verdauungsfermenten vorbehandelt. Wäre dies nicht der Fall gewesen, so hätte *Delitzsch* sicherlich das Archikarp von *Humaria anceps* in diesem Stadium nicht mit Querwandporen (Abb. 4 u. 3a) gesehen, sondern ohne Wanddurchbrechungen wie in Abb. 3b und 2e und 2f, und seine Befunde hätten mit denen von *Blackman* und *Frather* (2) sowie mit den meinigen übereingestimmt.

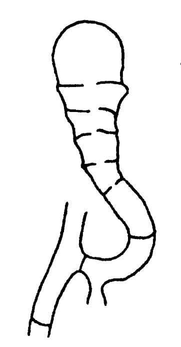


Abb. 4 *Humaria anceps var. aurantiaca*, Archikarp. Plasma verdaut, Membran gefärbt. Vergr. 325 mal. [Kopiert nach *Delitzsch* (7), Fig. 7.] (Erklärung im Text.)

Behandelt man umgekehrt der Form nach ausgebildete Archikarpien von *Humaria granulata*, wie sie etwa Abb. 3b und 2e und 2f zeigt, mit verdauenden Fermenten, so erhält man nachträglich bei der mikroskopischen Betrachtung Bilder mit Wanddurchbrechungen, wie sie in Abb. 3a und 4 von *Humaria anceps* wiedergegeben sind. Abb. 5 zeigt das Ergebnis einer der Versuche über die Wirkung von Pepsin- und Trypsinlösungen auf die gequollenen Querwände der Archikarpien von *Humaria granulata Quél.*



Abb 5. *Humaria granulata Quél.*
a) Eine Querwand aus dem Archikarp während der Hüllhyphenbildung. Querwandmitte stark linsenförmig gequollen.
b) Dieselbe Querwand wie in a), nach 16stündiger Behandlung mit Pepsinsalzsäure- und Trypsinbicarbonatlösung. Linsenförmige Wandquellung verdaut und an deren Stelle ein Wandporus. Wandungen gefärbt mit Tannin-Eisenchlorid. Vergr. 720 mal.

Entsprechende Versuche wurden auch bei den anderen hier angeführten Ascomyceten angestellt und hatten alle ein und dasselbe Ergebnis. Die Wanddurchbrechungen im Archikarp entstehen alle erst allmählich während der Bildung der ersten Hüllhyphen um das ausgebildete Archikarp. Den Wanddurchbrechungen geht immer eine

Quellung und chemische Veränderung der Querwandmitten im Archikarp voraus.

Wenn auch im System *Rhytisma acerinum Pers.* den Ascoboleen fern steht, so sind die Verhältnisse bei diesem Pilz doch ähnlich. In jungen Stadien des Archikarps stellte *Jones* (11) keine Querwandporen fest. Erst später treten Querwandporen auf. Das Archikarp von *Rhytisma acerinum* ist gleichgestaltet dem von *Ascobolus citrinus* und *A. furfuraceus* und stellt eine *Woronin*sche Hyphe dar.

Was weiter die Querwandporen betrifft, so hat *Ramlow* (14) bei *Ascophanus carneus Pers.* die interessante Feststellung gemacht, daß die Poren der apikalen und basalen Zellen des Archikarps durch stark färbbare Pfropfen verschlossen sind, so daß deren Kerne nicht in die mittlere Zelle wandern können. Leider geht aus der Arbeit *Ramlow*s (14) nicht hervor, in welchem Entwicklungsstadium des Archikarps er diese Beobachtung machte. Vielleicht hat er seinerzeit die linsenförmig gequollenen, stark färbbaren Querwandmitten vor der Porenbildung als Pfropfen bezeichnet, und er müßte dann nach vorliegenden Untersuchungsergebnissen Archikarpien vor sich gehabt haben, deren Hüllhyphenmantel noch nicht ausgebildet bzw. im Entstehen begriffen war. Sei dem wie es wolle, auf alle Fälle sind *Ramlow* schon 1914 die stark färbbaren, veränderten Querwandmitten als Pfropfen im Archikarp von *Ascophanus carneus Pers.* aufgefallen, die bei den in dieser Abhandlung besprochenen Pilzen überall vorübergehend vorhanden sind. Die Vermutung, daß diese Erscheinung noch bei vielen anderen schon früher und auch bei bisher noch nicht untersuchten Ascomyceten bei näherer Prüfung zutage tritt, liegt nahe.

b) Querwandporen im Mycel.

Ähnlich wie im Archikarp ist die Bildung der Querwandporen im Mycel, und die in der Folge zu beschreibende Beobachtung deutet darauf hin, daß die Entstehung der Wanddurchbrechungen im Mycel mit derjenigen im Archikarp im Zusammenhang steht, besonders auch, was die Ausbildung und Ernährung der Fruchtkörper (Apothecium oder Perithecium) betrifft, die bei manchen Pilzen genannter Gattungen einen Durchmesser bis zu 5 mm erreichen. In den Hyphen koprophiler Ascomyceten sind Querwandporen nur teilweise festgestellt worden, so bei *Ascophanus carneus* durch *Ternetz* (22), bei *Ascodesmis nigricans* durch *Dangeard* (5) und bei *Lasiobolus pulcherrimus* und *Humaria anceps* durch *Delitzsch* (7). *Delitzsch*s Vermutung, daß die Querwände der Hyphen wahrscheinlich aller Ascomyceten von je einem zentralen Porus durchbrochen sind, kann sich wohl mit der Zeit bestätigen. Vorläufig sind aber noch zu wenig Arten untersucht. Bei *Ascobolus furfuraceus, A. citrinus* und *Humaria granulata* wurden Querwandporen im

Mycel bereits aufgefunden. Allerdings sind die Poren in den Querwänden nicht von Anfang an vorhanden, sondern werden nach Beobachtung in Kulturen nacheinander in akropetaler Folge im Mycel ausgebildet, so daß völlig ausgebildete Querwandporen nur in ganz bestimmten Abschnitten des Pilzthallus mikroskopisch festzustellen sind. Daher kam es auch, daß ich z. B. bei *Ascobolus citrinus* und anderen Pilzen früher das eine Mal vereinzelt Querwandporen im Mycel vorfand, ein anderes Mal wieder überhaupt keine. Man muß hier also die Untersuchungen des Mycels auf die Querwandporen von einem einheitlichen Gesichtspunkt aus anstellen und darf nicht einfach aus der Prüfung der Hyphen eines an beliebiger Stelle des Thallus entnommenen Mycelausschnittes auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Querwandporen im ganzen Thallus schließen. In welchen Regionen des Thallus wir Hyphenquerwandporen zu suchen haben, darüber geben uns am besten Plattenkulturen von Pilzen Aufschluß, in denen schon Fruchtkörperbildung eingetreten ist.

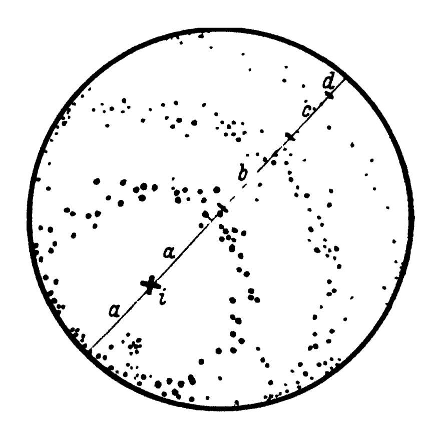


Abb 6. *Humaria granulata Quél.*
12 Tage alte Plattenkultur mit zahlreichen reifen und in der Entwicklung begriffenen Apothecien, welche zu unvollständigen Hexenringen angeordnet sind. $^2/_3$ natürl Größe. (Nähere Erklärung im Text.)

Als Beispiel diene Abb. 6, welche die Aufsicht auf eine 12 Tage alte Plattenkultur von *Humaria granulata* darstellt. In Abb. 6 sind die Apothecien wie im Freien zu Hexenringen angeordnet. Infolge der ungenügenden Größe der Kulturschale sind die Hexenringe unvollständig, und am Rande der Schale sitzen die Apothecien oft etwas gedrängt zusammen, was auf die Wachstumsänderung des Mycels — hervorgerufen durch den Schalenrand — zurückzuführen ist. Das Mycel ist hier nicht mit eingezeichnet. Der mit *i* und Kreuz (×) bezeichnete Punkt bedeutet die Impfstelle. Die auf dem Durchmesser der Schale eingezeichneten Abschnitte *a*, *b*, *c* und *d* geben die Zwischenzonen von Hexenring zu Hexenring an. Im jungen Thallus von *Humaria granulata* — ebenso ist es auch bei den anderen hier besprochenen Pilzen —, der sich erst etwa 3 bis 4 cm im Umkreis um die Impfstelle auf dem Nährboden ausgebreitet hat, suchen wir vergebens nach Hyphenquerwandporen; es sind keine vorhanden. Nach Verlauf einiger Tage und Weiterentwicklung des Mycels treten an diesem in der Nähe der Impfstelle, kreisförmig um diese angeordnet, die ersten Fruchtkörper

auf, die mit bloßem Auge als wenig über das Substrat erhabene Kügelchen zu sehen sind und zusammen den ersten Hexenring bilden. Die Entfernung dieses ersten Fruchtkörperringes um die Impfstelle entspricht etwa dem Abstand *a* in Abb. 6 und 7. Beide Abbildungen sind allerdings nach 8 bis 12 Tage alten Plattenkulturen entworfen, denn sie zeigen gleichzeitig, daß die Fruchtkörperbildung in großem

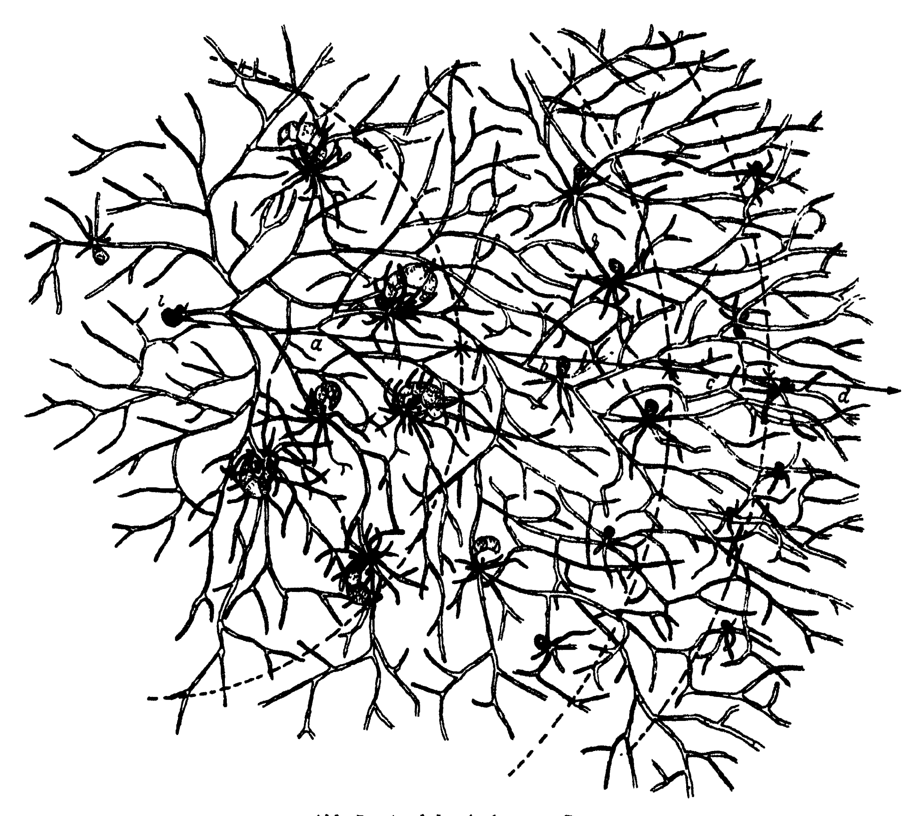


Abb. 7. *Ascobolus furfuraceus Pers.*
Ausschnitt aus einer 8 Tage alten Plattenkultur. Die in der Entwicklung begriffenen Fruchtkörper sind hexenringförmig angeordnet. Vergr. 80 mal.

Umfang in verschiedenen Regionen des Thallus vor sich gegangen ist, indem schon drei aufeinanderfolgende, wenn auch nicht vollständig ausgebildete Hexenringe angelegt sind. Den Abbildungen ist auch zu entnehmen, daß die der Impfstelle am nächsten liegenden Fruchtkörper (erster Hexenring) die ältesten und infolgedessen in der Ausbildung am weitesten vorangeschritten sind. Es folgen dann mit dem Spitzenwachstum des Mycels in gewissen Abständen (*b*, *c* und *d*, Abb. 6 und 7) weitere Hexenringe, und die jüngsten Fruchtkörper bzw. deren Anlagen liegen nächst der Thallusperipherie.

Bei der Feststellung der Wanddurchbrechungen arbeitete ich immer mit gefärbtem Material. Die Tannin-Eisenchloridfärbung ist hier besonders zu empfehlen (17), weil sie auf die Wandungen und auf die später noch zu besprechenden „metachromatischen Körperchen" in den Zellen beschränkt bleibt. Auch die Silberimprägnierung ist gut, doch etwas umständlicher. Trotz der Färbung erfordert die einwandfreie Feststellung von Querwandporen im Mycel erhebliche Mühe. Bei der mikroskopischen Prüfung ist das Einknicken einzelner Hyphen durch Verschieben des Deckglases oft von Vorteil, da deren Querwände dann teilweise in der Aufsicht zu sehen sind.

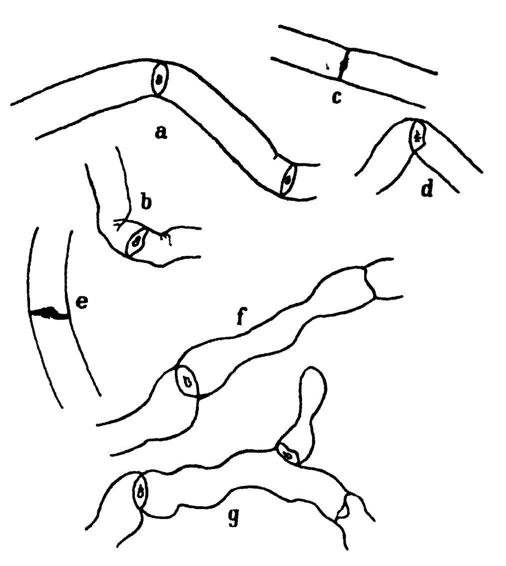


Abb. 8. *Humaria granulata Quél.*
a), b), f) und g) Hyphen mit Poren in den Querwänden. c), d) und e) Hyphenstücke mit gequollenen Querwandmitten; Porus erst im Entstehen begriffen. Vergr. 450mal. (Erklärung im Text.)

Nehmen wir nun z. B. von 8 bis 12 Tage alten Kulturen, wie sie etwa die Abb. 6 und 7 veranschaulichen, und deren Wachstum durch keine mechanischen Eingriffe gestört wurde, aus dem Abschnitt *a* zwischen dem ersten Hexenring und der Impfstelle Mycel zur mikroskopischen Prüfung heraus, so werden wir, wenn die Apothecien im ersten Hexenring ganz ausgebildet sind oder das Archikarp zum mindesten schon teilweise von Hüllhyphen umgeben ist, fast in allen Mycelquerwänden Poren vorfinden (Abb. 8a und 8b). In noch älteren Kulturen finden wir die einzelnen Hyphenzellen in diesem Thallusabschnitt oft etwas mißgestaltet. Es sind dies Involutionsformen (Abb. 8f und 8g).

Untersuchen wir weiter z. B. aus einer dem Abschnitt *b* (Abb. 7) entsprechenden Thallusregion das Mycel, so finden wir dort die meisten Hyphenquerwände erst gequollen, wie es etwa die Abb. 8c, 8d und 8e zeigt, selten ganz durchbrochen. Die Archikarpien an der Peripherie eines solchen Abschnittes (Abb. 7b) sind erst im Entstehen begriffen, also noch nicht völlig ausgebildet wie diejenigen im Abschnitt *a* und auch noch nicht wie dort teilweise mit Hüllhyphen umgeben. Die gequollenen Zentren der Hyphenquerwände werden durch Jod gebläut und färben sich mit Korallinsoda ebenfalls rot. Läßt man auf derartig gequollene

Hyphenquerwände peptische und tryptische Fermente nach *Delitzschs* Methode[1] einwirken, so entstehen an Stelle der Quellstellen Wanddurchbrechungen. Die gequollenen Querwandzentren in den Hyphen sind also auch hier die Vorboten der später entstehenden Wandporen.

Mit der Untersuchung des Mycels noch weiter spitzenwärts voranschreitend — etwa Abschnitt *c*, Abb. 7 —, finden wir hier weder Querwandporen noch gequollene Querwände, sondern Querwände normaler Beschaffenheit, die auch durch Verdauungsfermente nicht verändert werden. In dieser Region sind die Fruchtkörperanlagen nicht mehr mit bloßem Auge, sondern erst unter Zuhilfenahme einer starken Lupe oder bei schwacher mikroskopischer Vergrößerung zu erkennen. Über die Zone *c* hinaus (Abb. 7d) finden wir überhaupt noch keine Fruchtkörperanlagen vor, und bis zur Peripherie des Hyphenthallus sind die Hyphenquerwände ebenfalls normal ausgebildet. Es sind weder Querwandporen noch Anzeichen für deren Ausbildung (Membranquellungen) aufzufinden. Die Hyphenquerwände werden also im Mycel ebenso wie die Archikarpquerwände erst zu einer ganz bestimmten Zeit durchbrochen, und die Entstehung der Poren richtet sich ganz nach der Ausbildung der Fruchtkörper, steht mit deren Entwicklung, wie schon gesagt, im Zusammenhang. Jede Hexenringregion ist demnach, auf den ganzen Thallus bezogen, ein selbständiger Entwicklungsabschnitt.

Wir finden also in der Region des Mycels, in der die Archikarpien schon von Hüllhyphen umgeben sind, fertige Querwandporen, in einer solchen, in der erst Anfänge der Archikarpumhüllung vorhanden sind, nur gequollene Hyphenquerwände und in der darauffolgenden, noch jüngeren Thallusregion überhaupt noch keine Anzeichen von Querwandporen neben ganz jungen Archikarpienanlagen, wie sie etwa die Abb. 1a und 1b und 2a, 2b und 2c wiedergeben. Die Querwandporen im Mycel sind also auch nicht von Anfang an vorhanden!

Für den Zusammenhang der Querwandporenentstehung im Mycel mit der Ausbildung bzw. der Ernährung der Fruchtkörper spricht folgendes meines Erachtens wertvolles und zum Teil schon früher (15) festgestelltes Beobachtungsergebnis:

Die Versuche wurden mit *Ascobolus citrinus*, *A. furfuraceus*, *Humaria granulata*, *Ascophanus carneus* und einigen anderen Pilzen angestellt. Das Mycel entwickelt sich sowohl bei völliger Dunkelheit als auch am Licht. In völliger Dunkelheit entstehen an den Mycelien niemals Fruchtkörper. Auf deren Bildung hat das Licht einen wesentlichen Einfluß. Die Fruchtkörper müssen ja auch in der Natur an der

[1] Zuerst acht- bis zehnstündige Einwirkung von Pepsinsalzsäure, darauf von Trypsin in Kalium- oder Natriumbicarbonatlösung.

Oberfläche des Substrates angelegt werden, da die Asci bei der Reife stark positiven Phototropismus aufweisen und die Sporen wie bei den Sporangienträgern von *Pilobolus* dem Lichte zu abgeschleudert werden. Läßt man vorher verdunkelte Mycelien eine Zeitlang im Lichte stehen, bis die ersten Fruchtkörper entstanden sind und eine bestimmte Größe erreicht haben, und verdunkelt dann wieder, so entwickeln sich die Fruchtkörper nicht weiter. Bei diesen Versuchen kann dann sehr gut der enge Zusammenhang von Querwandporenbildung im Mycel mit der Fertigstellung der Archikarpumhüllung bzw. des Apo- oder Peritheciums studiert werden. Besonders auffällig ist, daß in Hyphen fruchtkörperloser Thalli keine Querwandporen festzustellen sind, seien nun die Thalli im Dunkeln oder im Licht gewachsen. Treten in Reinkulturen von genannten Pilzen etwa infolge falscher Ernährung auch bei Licht am Mycel keine Fruchtkörper auf, so bleiben die Querwände der Hyphenzellen undurchbrochen. Es tritt dann meistens gezwungenerweise Konidien- bzw. Oidienbildung ein, die bei normaler Ernährung unterbleibt und eigentlich keine natürliche, normale Nebenfruktifikation darstellt.

Für den Aufbau der zahlreichen Fruchtkörper (Apo- und Perithecien) sind natürlich besonders große Mengen Nährstoffe notwendig. Das Wachstum der Fruchtkörper geht nämlich auffallend rasch vor sich, wie dies auch bei den Fruchtkörpern unserer Speisepilze der Fall ist. Die Aufnahme der Nährstoffe aus dem Substrat geschieht durch das reich verzweigte Mycel, das, wie wir an Agar- und Gelatineplattenkulturen beobachten, nicht nur oberflächlich auf dem Nährboden weiterwächst, sondern auch „Senker" in das Substrat hineinsendet. Zur Zeit der Fruchtkörperbildung ist daher das Mycel für die Zuleitung von Aufbaustoffen zu den sich rasch entwickelnden Fruchtkörpern ganz besonders in Anspruch genommen. Die einzelnen Zellen weisen zu dieser Zeit eine sehr lebhafte Plasmaströmung auf, die sich auch, was allerdings schwer zu sehen ist, durch die Querwandporen fortsetzt, und gerade hier würde die Entstehung der Hyphenquerwandporen eher allein auf den gesteigerten Nährstofftransport zurückzuführen sein, als dies bei den schon zu dieser Zeit fertiggestellten Archikarpien der Fall ist, welche nur noch der Umhüllung durch den Hüllhyphenmantel bedürfen. Trotz des durch die Querwandporenbildung im Mycel erleichterten Nährstofftransports zu den rasch wachsenden Fruchtkörpern ist anscheinend die Nährstoffzuleitung nicht ausreichend. Die lebhafte Plasmaströmung im Mycel fruchtkörperwärts läßt bald nach, und in der Nähe der Apothecien oder Perithecien, in denen schon ein Teil der Asci ausgebildet ist, enthalten die Hyphenzellen nur noch Spuren von Plasma und sind teilweise schon funktionslos geworden und im Absterben begriffen. Man erkennt diesen Zustand schon an der Form des Mycels, dessen Zellen deformiert sind (Abb. 8f und 8g).

Der gesteigerte Nährstofftransport durch das Mycel zu den Fruchtkörpern dauert also auch wieder nur eine ganz bestimmte Zeit. Meistens werden die Fruchtkörper innerhalb 2 bis 3 Tagen vollständig fertiggestellt, d. h. bis zur Entstehung der ersten Asci. Offenbar wird das Plasma der Hyphenzellen nach Entstehung der Querwandporen samt den Nährstoffen fast restlos zum Aufbau des sich sehr rasch entwickelnden Hüllhyphenmantels und des Hymeniums der Fruchtkörper benötigt und nach diesen Stellen befördert. Der, von der Impfstelle ausgehend, vor einem Hexenring liegende Mycelabschnitt bzw. dessen Zellen sind schon teilweise funktionslos geworden und plasmaarm, bevor die Fruchtkörper alle Asci ausgebildet haben. Da die zahlenmäßige Ausbildung der Asci aus der ascogenen Zelle des Archikarps bei den meisten Ascomyceten sehr reich ist, müßte demgemäß die Nahrungszufuhr auf dem Wege durch das Mycel zu den Fruchtkörpern bis zur Beendigung der Ascusbildung nicht ausreichen. Die Ascusbildung würde also infolge mangelnder Nährstoffzufuhr zu einem gewissen Zeitpunkt ins Stocken geraten, was aber nicht der Fall ist, da die Neubildung einer großen Anzahl von Asci noch eine geraume Zeit fortdauert, nachdem die ersten ausgebildeten Schläuche schon ihre Sporen entleert bzw. abgeschleudert haben.

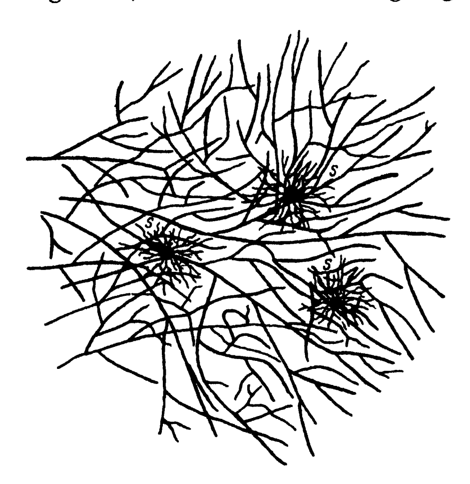


Abb. 9. *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.* Ausschnitt aus einer Agarplattenkultur (Aufsichtsbild). Mycel mit drei halbreifen Apothecien bei Lupenvergroßerung. *s* = sekundärer Thallus. Vergr. etwa 2,5mal. (Erklärung im Text.)

In Quetschpräparaten von Ascoboleen- und *Ascophanus*-Fruchtkörpern kann man je nach deren Alter 50 bis 150 und mehr Asci in den verschiedensten Entwicklungsphasen zählen. Sind die Sporen gefärbt, so sehen wir die Fruchtscheibe der betreffenden Fruchtkörper bei Lupenvergrößerung punktiert (Abb. 9). Besonders deutlich ist dies bei den Ascoboleen zu sehen, bei denen die reifen Asci zum Unterschied von den Pilzen der Gattung *Ascophanus* etwas über die Fruchtscheibe (Hymenium) hinausragen. Während die mit halbreifen Fruchtkörpern in Verbindung stehenden Hyphen schon plasmaärmer werden und in Degeneration begriffen sind, hat sich um jeden dieser Fruchtkörper auf dem Nährsubstrat ein kleiner sekundärer Hyphenthallus gebildet, der die weitere selbständige Ernährung jedes der betreffenden Frucht-

körper sicherstellt. Blickt man schräg über eine Agar- oder Gelatineplattenkultur eines koprophilen Ascomyceten, welche halbreife Apothecien enthält, so sieht man diese oft schon mit bloßem Auge, besser aber mittels einer Lupe, von einem schwach weißlich schimmernden, flaumartigen, kreisförmigen Hof umgeben, der den sekundären Thallus darstellt und aus sehr feinen Hyphen besteht (Abb. 9, *s*). Jeder Fruchtkörper ist also nach Ausbildung dieses kleinen Thallus, was die Ernährung anbelangt, mit einem eigenen, aber sehr kleinen Thallus selbständig und unabhängig vom ursprünglichen, gemeinsamen Hyphenthallus (primäres Mycel) geworden. Diese neue Mycelbildung dient gleichzeitig der Befestigung der Fruchtkörper auf dem Substrat und ihrer weiteren Ernährung. Diese Hyphen sind aber so fein, daß ich bis jetzt Querwandporen in ihnen nicht mit Sicherheit feststellen konnte, so daß diese Frage vorläufig offenbleibt.

Die Entstehung dieser kleinen Sekundärthalli geht der Hyphenmantelbildung um das Archikarp parallel. Mit der Beendigung der Ascusbildung schrumpfen die Fruchtkörpergehäuse allmählich zusammen, und das nachtraglich um diese gebildete feine Mycel degeneriert ebenfalls.

c) Fibrosinkörperchen in den Sporen.

Um die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Einblicke in die Pilzzelle zu erweitern, war auch eine mikrochemische Untersuchung bestimmter Objekte erforderlich. In erster Linie galt diese den Sporen. Im allgemeinen kann man sich über den Sporeninhalt vieler Pilze schlecht orientieren. Ein Haupthindernis bildet die Sporenwandung, die oft gerillt und gefurcht, zudem noch gefarbt ist, mitunter auch stachlige Auswüchse besitzt. Bei den Gattungen *Ascobolus* und *Ascophanus* finden wir, mit wenigen Ausnahmen, am häufigsten eine violette bis braune Sporenwand mit feinen zum Teil zusammenfließenden Längsstreifen oder Längsfurchen vor. Die Bleichung oder Entfärbung der Sporenwandungen genügt oft nicht, um sich eingehend über den Sporeninhalt orientieren zu können. Wohl sehen wir nach solchen Manipulationen und nach vorangegangener Fixierung und Färbung des Plasmas den Zellkern sowie auch Öltropfen im Plasma, die gewisse Farbstoffe besonders stark aufnehmen. Doch ist uns bisher dabei vielleicht noch manches, wie wir im folgenden sehen werden, entgangen. Es liegt zum Teil wiederum an der Methode, die das Auffinden mancher, gerade im Sporenplasma eingebetteter Stoffe erschwert. Werden z. B. Ascoboleensporen nach vorangegangener Fixierung mit fettunlöslichen Fixierungsmitteln nach der *Heidenhain*schen Eisenalaun-Hämatoxylinmethode gefärbt und diese Präparate mit solchen verglichen, die mit Anilinfarbstoffen tingiert wurden, so täuscht die *Heidenhain*sche Methode viel mehr Fetttröpfchen, als schwarzblau ge-

färbte, meistens runde Körperchen vor, als in Wirklichkeit im Sporenplasma vorhanden sind. Eine Prüfung mit spezifisch fettfärbenden Mitteln, z. B. Sudan III, zeigt die Unterschiede noch deutlicher. Diese auffälligen Beobachtungen veranlaßten mich, auch einmal Untersuchungen auf Plasmaeinschlüsse nicht an ganzen Sporen, sondern an Sporenschnitten vorzunehmen. Hierzu trugen noch die Untersuchungsergebnisse *Zopfs* (25) bei, die sich allerdings auf eine andere Pilzgattung beziehen, und die frühere Vermutung, es könnte sich bei dem einen oder anderen der vorliegenden Pilze um ähnliche Erscheinungen handeln, wie von *Zopf* erwähnt sind, hat sich nachträglich bestätigt.

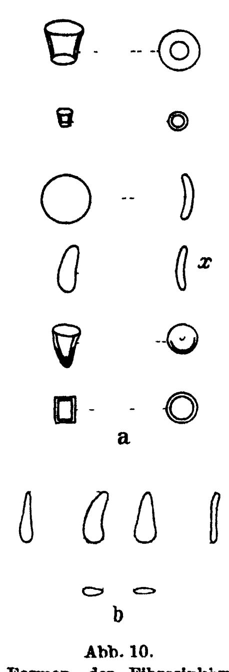


Abb. 10.
a) Formen der Fibrosinkörperchen aus den Sporen von *Podosphaera oxyacanthae* in verschiedenen Ansichten. Vergrößerung 1000mal. Nach *Zopf*.
b) Fibrosinkörperchen aus den Sporen von *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.* in verschiedener Ansicht. Vergr. 1150 mal.

Auf die *Zopf*sche Arbeit (25) ist verschiedentlich hingewiesen, namentlich auch von *H. Molisch* (12), der sagt: In den Sporen (Konidien) des auf dem Weißdorn häufigen Mehltaupilzes *Podosphaera oxyacanthae* und anderer Erysipheen entdeckte *Zopf* eigentümliche Körperchen, deren Substanz er für ein Kohlenhydrat hält, und die er wegen Verwandtschaft ihrer Substanz mit *Frémys* Fibrosin als Fibrosinkorper bezeichnet. Sie liegen in reifen Konidien stets im Plasma, und zwar 5 bis 15 an der Zahl. Durch einen auf das Deckglas ausgeübten Druck lassen sie sich leicht aus der Zelle befreien. Sie haben die Form einer Scheibe, eines Hohlkegels, Hohlstutzens oder eines Hohlzylinders (Abb. 10). Ihr Durchmesser schwankt zwischen 2 bis 8 μ und ihre Dicke zwischen 0,5 bis 0,7 μ. Sie zeigen keine Struktur und sind optisch inaktiv. Die Fibrosinkorper quellen etwas in siedendem Wasser. Mit Jodlösung oder Chlorzinkjod färben sie sich nicht. Sie sind schwer löslich in konzentrierter Schwefelsäure, unlöslich in Salpetersäure, Kupferoxydammoniak, Alkohol, Äther und Chloroform; Anilinfarbstoffe werden nicht gespeichert; durch Osmiumsaure werden sie nicht gebräunt. Da die Fibrosinkörper bei der Keimung der Sporen aufgelöst werden, scheinen sie als Reservestoff zu dienen. *Zopf* (25) glaubt, eine Verwandtschaft mit der Pilzcellulose annehmen zu sollen; es wäre daher zu prüfen, ob die Fibrosinkörper nicht vielleicht aus Chitin bestehen[1].

---

[1] Schon früher hatte *Pringsheim* (13) im Plasma von Saprolegniaceen und *Bryopsis* „Cellulinkorner“ gefunden, deren Substanz er als eine Modifikation der Cellulose betrachtet. Nach *Barret* (1) geben auch die Querwände (Septen) von *Blastocladu strangulosa* die Cellulinreaktion. Auch bei *Leptomitus* finden sich Cellulinkörper, die öfters Querwände vortäuschen (vgl. *E. Gäumann:* Vergleichende Morphologie der Pilze, Jena, G. Fischer, 1926. S. 69).

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Sporen mehrerer Ascoboleen und nahestehender Gattungen. Allerdings sind die bei den Erysipheen als Fibrosinkörperchen bezeichneten Gebilde in den Sporen der hier besprochenen Pilze nicht so zahlreich und auch nicht so mannigfaltig gestaltet, sondern sie weisen bei allen Pilzen, die ich bisher untersuchte, (*Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.*, *A. furfuraceus Pers.*, *A. strobolinus nov. spec. Schw.*, *Humaria granulata Quél.*, *Pyronema confluens Tul.* und *Ascophanus carneus Pers.*), im allgemeinen ein und dieselbe Form auf. Im Sporenplasma einiger unserer Speisepilze fand ich ebenfalls

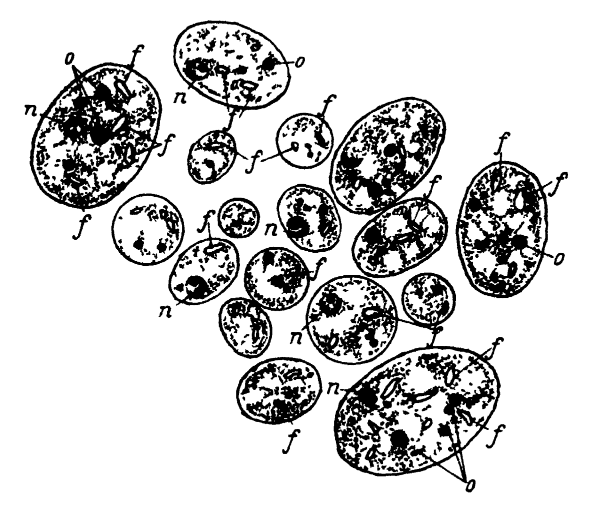


Abb. 11. *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.*
Sporenschnitte, gefärbt nach der *Flemming*schen Dreifachfärbung. Schnittdicke 3 μ. Vergr. 540mal.
n = Zellkern, *o* = Öltropfen, *f* = Fibrosinkörperchen.

solche Körperchen vor. Im folgenden sei nur das Ergebnis der Untersuchung von Sporen und Mycel von *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.* beschrieben.

Als Material dienten die in ungeheurer Menge an den Schalendeckel geschleuderten Ascosporen von Kulturen, die nach der Mullseidenmethode (16) auf kalt sterilisiertem Kaninchenmist (19, 20) in *Petri*-Schalen angelegt waren.

Die Sporen wurden mittels eines Deckgläschens, das als Spatel diente, von der Innenfläche des Schalendeckels abgeschabt, in ein kleines, dünnes Präparatenzylinderchen aus Glas von etwa 2 ccm Inhalt gegeben und mit Fixierflüssigkeit nach *Carnoy* oder *Merckel* behandelt. Die Sporen sammeln sich alle auf dem Boden des Röhrchens. Nach dem Auswaschen der Fixierflüssigkeit und dem Überführen der Sporen in Alkohol über Xylol in Paraffin in ein und demselben Gläschen, ließ ich nach Austreibung des Xylols das Paraffin erkalten. Die Sporen befanden sich infolgedessen alle im Paraffin in der Nähe des Gefäßbodens. Nach der Zertrümmerung des dünnen Glasröhrchens wird das auf diese Weise entstandene Paraffinsäulchen auf-

geblockt und mittels des Mikrotoms in 1 bis 5 μ dicke Schnitte zerlegt, die auf Objektträger aufgeklebt werden. So erhält man eine Unmenge von Schnitten durch die Sporen nach allen, wie die Abb. 11 zeigt, nur möglichen Richtungen, und die verschiedensten Segment-, Quer-, und Längsmedianschnitte wechseln in den Präparaten miteinander ab (Abb. 11). Gefärbt wurde meistens mit Safranin-Lichtgrün oder nach der *Flemming*schen Dreifachfärbung.

In den Sporenschnitten (Abb. 11) sehen wir außer dem gefärbten Zellkern, der allerdings nicht in jedem Schnitt getroffen ist, das Plasma, darin dunkler gefärbte ungleich große Kügelchen, mehr oder weniger unregelmäßig verteilt, von Öl und zudem kleine längliche Körperchen, die nach oben angeführten Färbemethoden ungefärbt geblieben sind. Diese Körperchen sind in den mikroskopischen Schnittbildern sehr leicht zu übersehen. Bei näherer Betrachtung zeigen sie Spitzei- oder Gurkenform und sind der Länge nach flach gedrückt. Man könnte, was die Gestalt anbetrifft, zum Vergleich auch Leinsamen heranziehen. Beim Rollen unter dem Mikroskop ist die Abplattung dieser Körnchen gut zu sehen, besonders bei Dunkelfeldbeleuchtung (Abb. 13). Ihre Länge schwankt zwischen 1 und 3 μ, ihre Dicke zwischen 0.5 bis höchstens 2 μ. In Abb. 10b (S. 168) sind zwei solcher Körperchen stärker vergrößert abgebildet; sie gleichen einem der ebenfalls in Abb. 10a nach *Zopf* (25) wiedergegebenen Fibrosinkörperchen (x) aus den Sporen (Konidien) von *Podosphaera oxyacanthae*. Man kann diese Körperchen noch deutlicher sichtbar machen, indem man das Plasma überhaupt ungefärbt läßt und zum Färben der Schnitte einen ausgesprochenen Membranfarbstoff verwendet. In Abb. 12 sind der Abb. 11 entsprechende Sporenschnitte dargestellt. Diese wurden nur mit Tannin-Eisenchlorid gefärbt, so daß die Färbung sich auf die Sporenwandungen und auf die im Plasma eingebetteten, erwähnten Körperchen beschränkt.

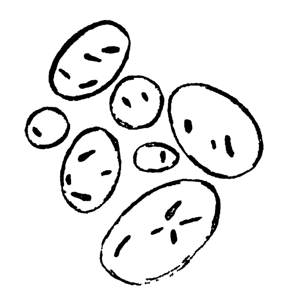


Abb. 12. *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.*
Sporenschnitte, Schnittdicke 3 μ. Gefärbt mit Tannin-Eisenchlorid. Die Färbung ist auf die im Plasma eingebetteten Fibrosinkörperchen und auf die Sporenwandung beschränkt. Vergr. 430mal.

Man kann die im Sporenplasma eingeschlossenen Körperchen zur besseren Sichtbarmachung auch teilweise isolieren. Hat man sehr viel Sporenmaterial zur Verfügung, was bei Plattenkulturen nach der Mullseidenmethode (15) der Fall ist, so werden die Sporen in einer rauhen, also innen unglasierten Apotheker-Pulverreibschale zerrieben und nach dem Verreiben mit etwas Wasser aufgeschlemmt. Die wässerige Aufschwemmung wird auf ein Stückchen feinster Seide, wie sie etwa zur Herstellung von Damenblusen Verwendung findet, gegossen und die Seide hierauf durch Zusammendrehen zwischen den Fingern aus-

gewunden bzw. ausgedrückt. Die abgelaufene Flüssigkeit enthält dann die besprochenen Körperchen, während der größte Teil der Sporenwandungen auf der Seide zurückbleibt. Die Beobachtung der isolierten Körperchen erfolgt am besten bei Dunkelfeldbeleuchtung (Abb. 13). Da diese im Sporenplasma der eben besprochenen Pilze vorgefundenen Körperchen ähnliche Eigenschaften und Gestalt aufweisen wie die von *Zopf* (25) in den Sporen (Konidien) von *Podosphaera oxyacanthae* festgestellten, mit dem Ausdruck „Fibrosinkörperchen" belegten Körnchen, will ich in den vorliegenden Fällen diese Benennung auch beibehalten.

Die hier aufgefundenen Fibrosinkorperchen sind wie die von *Zopf* und *Molisch* beschriebenen strukturlos (siehe besonders Abb. 13). Auch sind sie optisch inaktiv. Anilinfarbstoffe werden von ihnen, solange die Sporen sich im Ruhestadium befinden, nicht gespeichert, doch farben sie sich mit Eisenalaun-Hamatoxylin nach *Heidenhain* sehr stark. Entsprechend den *Zopf*schen Befunden werden sie auch durch Osmiumsaure nicht gebraunt. Eigentumlich ist, daß man diese Fibrosinkorperchen in frisch aus den Asci geschleuderten Sporen nicht vorfindet. Sie scheinen sich erst allmahlich wahrend der Ruhe der Sporen zu bilden. Vielleicht darf man diese Erscheinung mit einer anderen in Zusammenhang bringen: Frisch abgeschleuderte Sporen von Ascoboleenpilzen und verwandten Gattungen keimen nämlich nicht oder sehr schlecht. Die Sporen scheinen, entsprechend den Samen vieler höherer Pflanzen, einer gewissen Ruheperiode zu bedurfen, bevor die normale Keimfahigkeit erreicht ist. Die Fibrosinkorperchen scheinen, wie die von *Podosphaera oxyacanthae*, als Reservestoff zu dienen, da sie bei der Keimung der Sporen aufgelöst werden.

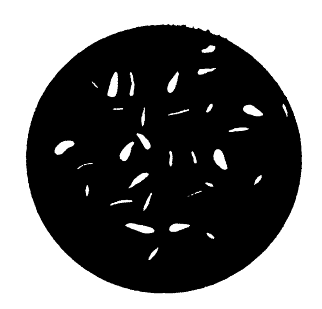


Abb 13 Isolierte Fibrosinkorperchen aus den Sporen von *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.* im Dunkelfeld. Vergr. 600 mal

Von der chemischen Zusammensetzung der bei vorliegenden Untersuchungen aufgefundenen Fibrosinkörperchen gilt vorerst dasselbe, was schon von den *Podosphaera*-Fibrosinkörnchen gesagt ist. Aus dem folgenden ist aber noch zu entnehmen, daß ihre chemischen Eigenschaften denjenigen der Hyphenmembranen gleich oder ganz ähnlich sein mussen, namentlich wenn wir die Fibrosinkörperchen in der keimenden Spore betrachten.

Die reifen Sporen der Ascoboleen und verwandten Gattungen sind im Ruhezustand gleichmäßig stumpfelliptisch geformt. Bringt man z. B. die Sporen von *Ascobolus citrinus*, nachdem sie schon einige

Wochen aus den Asci entleert sind, in der Absicht, sie keimen zu lassen, mit Wasser zusammen oder auf ein feuchtes festes Nährsubstrat, so quellen sie vor der Keimung sehr stark auf. In Schnittpräparaten

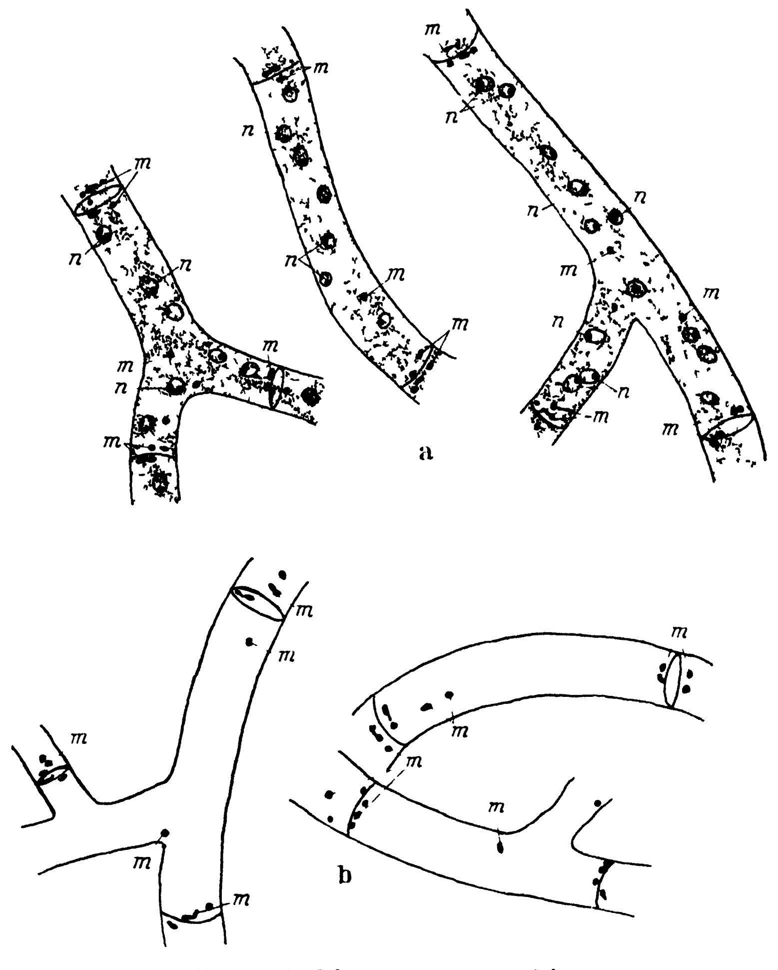


Abb. 14. *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.*
n = Zellkerne, m = metachromatische Körperchen.
a) Einzelne Hyphenzellen. Gefärbt mit Eisenalaunhämatoxylin nach *Heidenhain*.
b) Einzelne Hyphenzellen nach Verdauung des Plasmas und Färbung mit Tannin-Eisenchlorid.
Vergr. 540mal. (Erklärung im Text.)

solcher gequollener Sporen sind die Fibrosinkörperchen ebenfalls gequollen und dann im mikroskopischen Bild etwas undeutlich umrissen. In diesem Zustand färben sie sich mit Korallinsoda leuchtend rot, was in Schnitten durch die ruhende Spore nie der Fall ist. Speicherung von Korallinsoda findet in den Fibrosinkörperchen also nur nach deren Quellung

kurz vor der Sporenkeimung statt. Auch Jod färbt in diesem Zustand die Fibrosinkörnchen und ihre nächste Umgebung blau. Diese Eigenschaften stehen in auffalligem Einklang mit denjenigen der Querwände des Archikarps und des Myeels, die sich in gequollenem Zustand vor der Querwandporenbildung mit Korallinsoda ebenfalls intensiv rot färben und mit Jod blauen. Analog den gequollenen Querwanden verhalten sich auch die gequollenen Fibrosinkörperchen gegenüber Verdauungsfermenten. In der ruhenden Spore widerstehen sie peptischen und tryptischen Fermenten, werden dagegen in Sporen, die sich im Quellungszustand, also kurz vor der Keimung befinden, durch solche Enzyme aufgelöst. Wie ich eben schon bemerkte, ist in der gekeimten Spore nichts mehr von den Fibrosinkorperchen zu sehen, sie haben sich aufgelost, und die Vermutung *Molisch*s, daß sie als Reservestoffe anzusehen sind, besteht zweifellos zu Recht

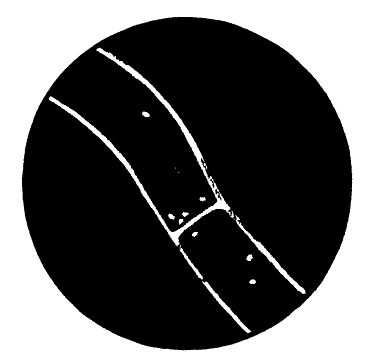


Abb 15 *Ascobolus citrinus nov. spec Schw.* Hyphenstrang mit intakter Querwand und metachromatischen Korperchen nach Verdauung des Plasmas bei Dunkelfeldbeleuchtung. Vergr 720 mal

d) Metachromatische Körperchen im Myeel.

Die eben besprochenen Eigenschaften der Fibrosinkorperchen sind, wie wir sehen werden, auch auf bestimmte Plasmaeinschlusse der Myeelzellen zu ubertragen. In diesen beobachtet man bei fast allen hoheren Pilzen im Plasma, hauptsachlich an den Querwanden nicht mehr ganz junger Myeelstrange, kleine Kornchen, die sich mit Eisenalaunhamatoxylin (*Heidenhain*) wie Öltropfen beinahe schwarz farben, sehr wenig aufnahmefahig fur Anilinfarbstoffe sind und als „*metachromatische Korperchen*“ bezeichnet werden (Abb 14, S. 172). Sie sind allerdings außerordentlich klein, in ungefarbtem Zustand stark lichtbrechend, zeigen nur bei sehr starker Vergroßerung eine kugel- bis eiformige Gestalt und liegen, wie eben gesagt, vorwiegend in der Nahe der Myeelquerwande (Abb. 14a, *m*) Nimmt man als Untersuchungsobjekt kraftiges Myeel, dessen Zellquerwande noch normal, also weder gequollen noch durchbrochen sind, behandelt es mit Verdauungsfermenten, wie eingangs besprochen, und farbt nachtraglich mit einem Membranfarbstoff wie z. B. Tannin-Eisenchlorid, so farben sich nur die Zellwände und als einzig übriggebliebener Zellinhalt, die „*metachromatischen Korperchen*“ (Abb. 14b). Abb. 15 stellt einen Hyphenstrang von *Ascobolus citrinus nov. spec.* mit intakter Querwand im Dunkelfeld dar, dessen Plasma vorher verdaut wurde. Wie in dieser Abbildung deutlich zu sehen ist,

bleiben nach Anwendung von Verdauungsfermenten als Zellinhalt nur die „metachromatischen Körperchen" übrig, deren Form hier besonders deutlich zum Ausdruck kommt.

Auffällig ist nun die starke Färbbarkeit der metachromatischen Körperchen in den Hyphenzellen mit Korallinsoda gerade zu der Zeit, zu der die Querwände dieser Mycelzellen gequollen sind und ebenfalls die Eigenschaft einer starken Korallinsodaspeicherung aufweisen. Man kann auch — allerdings ist dies etwas schwierig - in den Hyphenzellen mit gequollenen Querwänden gleichzeitig eine leichte Quellung der metachromatischen Körperchen feststellen. Läßt man nun auf Hyphen mit gequollenen Querwänden, wie schon angedeutet, Verdauungsfermente einwirken, so lösen sich die gequollenen Querwände auf. Gleichzeitig werden aber auch mit dem Plasma die schwach gequollenen metachromatischen Körperchen verdaut. Wie die gequollenen Mycelquerwände färben sich auch gequollene metachromatische Körperchen mit Jod blau. Sind die Querwände im Mycel in einem bestimmten Entwicklungsstadium aufgelöst, also Wanddurchbrechungen entstanden, so sind auch in diesen Zellen keine metachromatischen Korperchen mehr zu beobachten. Deren Auflösung scheint somit mit derjenigen der Zellquerwandmitten im Mycel parallel zu gehen. Diese Beobachtungen sprechen deutlich dafür, daß der Chemismus bei den Fibrosinkörperchen bzw. metachromatischen Korperchen und den Wandungen bei der Auflösung gleich, zum mindesten ähnlich ist. Es ist wohl anzunehmen, daß bei der Quellung der Querwände in den Archikarpien und Mycelzellen bzw. bei der Querwandporenbildung und ebenso bei der Wiederauflosung der Fibrosinkorper in der keimenden Spore und der metachromatischen Körperchen im Plasma der vegetativen Hyphen gewisse Fermente eine Rolle spielen. Die metachromatischen Körperchen fungieren zweifellos als Reservestoff. Bezieht man, von einer einzelnen Zelle ausgehend, die Zahl der metachromatischen Körperchen auf den ganzen Thallus, so stellen diese in ihrer Gesamtheit, so klein sie im einzelnen sind, schon eine ganz beträchtliche Reservestoffmenge dar.

Was die hier besprochenen, auf mikrochemischem Wege erschlossenen Reaktionen, wie diejenigen mit Jod und Korallinsoda anbelangt, so können sie allerdings keineswegs als eindeutige Reagenzien für ganz bestimmte, chemische Körper bezeichnet werden, namentlich wenn wir noch die Ergebnisse anderer Forscher zu Rate ziehen. Was es mit den direkt eine blaue Jodfärbung gebenden Zellwandstoffen der Pilze fur eine Bewandtnis hat, ist nach *Czapek* (5) bis jetzt noch unbekannt. *Crié* (3) hat die zugrunde liegende Substanz als Amylomycin bezeichnet. *Errèra* (8) wies auf die Möglichkeit hin, daß in den sich mit Jod bläuenden Ascis lichenin- und isolicheninhaltige Kohlenhydrate vorkommen. Bekannt ist die Jodbläuung unter anderen der Ascusspitzen vieler Disco- und mancher Pyrenomyceten wie *Sordaria* und *Sphaeria*, der

Hyphen des *Dematium pullulans* (21), der Sporenhäute des *Schizosaccharomyces octosporus* [siehe auch *Czapek* (5)].

Die von *Zopf* (25) beschriebenen und als Fibrosinkörperchen bezeichneten, eigentumlichen Inhaltskörperchen der *Podosphaera*-Konidien rechnet *Czapek* (5) zu den Zellwandkohlenhydraten der Pilze. Den Ausdruck „Fibrose" bzw. „Vasculose" gebrauchte zuerst *Frémy* für die Wandsubstanz der Gefäße höherer Pflanzen (5, S. 683). Nach *Foex* (9) fällt Fibrosin unter den Begriff „Callose", die aber vorerst auch noch selbst als problematischer Stoff angesehen werden muß. Nachdem *Zopf* (25) eine Verwandtschaft des Fibrosins mit der sogenannten Pilzzellulose angenommen hat, empfiehlt *Molisch* (12), die Fibrosinkörperchen einer Prüfung auf Chitin zu unterziehen. Bei den hier untersuchten Pilzen reagieren die Zellwände nicht immer gleich auf Chlorzinkjod. Man erhält dabei ganz unberechenbar hellbraune bis violettrote Färbungen, und zwar an Hyphen, die aus einer und derselben Kultur stammen. Die Fibrosinkörperchen färben sich mit Chlorzinkjod nicht. Die *Wisselingh*sche Chitosanreaktion (24) ist, auf Hyphenmembranen angewendet, nach meinen Erfahrungen nicht eindeutig und sehr unzuverlässig bei Anwendung auf die Fibrosinkörperchen, namentlich, wenn diese nicht aus der Spore isoliert sind, was größere Schwierigkeiten bereitet. Bemerkenswert ist vielleicht, daß die gequollenen Querwände in den Zellen der Hyphen und die Fibrosinkörnchen – diese aber nur kurz vor der Sporenkeimung – sowie die metachromatischen Korperchen in ebenfalls gequollenem Zustand Eiweißreaktion geben. Es ist aber meines Erachtens moglich, daß nur die an den genannten Zellbestandteilen angereicherten und tätigen Enzyme die Reaktion geben, ohne daß sie eine Beziehung zur chemischen Zusammensetzung der eigentlichen Untersuchungsobjekte hat. Callose zeigt allerdings auch schwache Eiweißreaktion und farbt sich mit Korallinsoda ebenfalls leuchtend rot. Chitin, Callose, Fibrosin haben die Unlöslichkeit in Kupferoxydammoniak gemeinsam, dagegen reagieren Callose und Fibrosin nicht auf Chlorzinkjod. Es wurden auch die Reaktionen fur Pektinstoffe zur Anwendung gebracht, ohne daß damit eine weitere Aufklärung gewonnen werden konnte. Ebenso wurden z. B. die Paradextrane berücksichtigt, die bei der Hydrolyse Traubenzucker liefern, nachdem *Tanrets* Fungose und wohl auch ein Teil der als Callose beschriebenen Stoffe mit Dextranen zusammenfallen sollen, aber ohne Gewinn fur die Aufklarung der Verhaltnisse in chemischer Hinsicht.

Zusammenfassung.

Untersucht wurden nach den angegebenen Richtungen hin die Pilze *Ascobolus immersus Pers.*, *A. furfuraceus Pers.*, *Humaria granulata Quél.*, *Ascophanus carneus Pers.* und *Ascobolus citrinus nov. spec. Schw.* Bei einigen anderen Pilzen, z. B. *Ascobolus strobolinus nov. spec. Schw.*

und *Pyronema confluens Tul.*, sind die Untersuchungen noch nicht abgeschlossen.

Die Kernverhältnisse, die hier allerdings nicht berührt worden sind, sind bei den erwähnten und auch schon von anderer Seite untersuchten apandrischen Formen in bezug auf Archikarp und Ascusbildung gleich. Übereinstimmung besteht auch in folgenden, kennzeichnenden Merkmalen:

1. Das Archikarp entsteht bei allen aus einem knollenförmigen Mycelauswuchs, gleichgültig ob es später die typische Form der *Woronin*schen Hyphe annimmt oder nicht. Es erfährt zuerst seine vollständige Ausbildung, die Querwände sind normal. Nach völliger Fertigstellung des Archikarps sprossen an seiner Basis — bei *Humaria granulata Quél.* aus den beiden Archikarpstielzellen – Hüllhyphen aus, die allmählich das ganze Archikarp als Mantel umgeben. Zur selben Zeit quellen die Archikarpquerwandmitten linsenformig auf. Die Quellstellen sind die Vorboten für die spater hier entstehenden Querwandporen. Sie farben sich mit Korallinsoda leuchtend rot und werden durch Jodlösung gebläut, durch peptische und tryptische Fermente gelöst. Die ungequollenen Wandungen zeigen keine dieser Reaktionen. Die Quellstellen werden allmählich aufgelöst, und es entstehen die Querwandporen, so daß eine Kernwanderung aus den Nachbarzellen in die größte Archikarpzelle (ascogene Zelle) stattfinden kann.

2. Die Mycelzellen weisen im Jugendstadium ebenfalls keine Querwandporen auf. Diese entstehen erst, nachdem die Querwandporenbildung in den Archikarpien schon eingesetzt hat, und nachdem diese schon zum größten Teil mit dem Hüllhyphenmantel umgeben sind. Die Querwandporenbildung in den Mycelzellen steht mit derjenigen in den Archikarpien in engem Zusammenhang und erleichtert den Nahrstofftransport für den weiteren Aufbau der Fruchtkörper. Um die Ernährung der rasch wachsenden Fruchtkörper zu fördern und diese mit dem Substrat enger zu verbinden, entsteht um jeden Fruchtkörper noch ein kleiner sekundärer Thallus. Der Durchbrechung der Querwände im Mycel geht wie im Archikarp eine Quellung ihrer Zentren voraus. Die gequollenen Hyphenquerwandmitten weisen, was die Farbbarkeit und das Verhalten gegenuber Verdauungsfermenten anbelangt, dieselben Eigenschaften wie die im Archikarp auf. Die Querwandporen entstehen im Mycel nicht alle gleichzeitig, sondern ihre Bildung richtet sich jeweils nach der Entwicklung der Fruchtkörper auf dem Thallus von Hexenring zu Hexenring in akropetaler Folge. In Hyphen fruchtkörperloser Thalli entstehen keine Querwandporen.

3. Im Plasma völlig nachgereifter Ascosporen sind kleine Körperchen eingebettet, die in Gestalt und in chemischer Beziehung an die von *Zopf* (25) in den *Podosphaera*-Konidien aufgefundenen Fibrosinkörper

erinnern. Bei der Keimung der Sporen werden diese „Fibrosinkörperchen“ aufgelöst. Der Auflösung geht eine leichte Quellung voran. In gequollenem Zustand sind sie zum Unterschied von denjenigen der ruhenden Spore mit Korallinsoda und Jod färbbar und werden durch Verdauungsfermente aufgelöst. Die Fibrosinkörperchen fungieren als Reservestoffe.

4. Die sogenannten „metachromatischen Körperchen“ in den Hyphenzellen scheinen ebenfalls als Reservestoffe zu dienen. Sie liegen meist in der Nähe der Querwände. Während der Quellung der Hyphenwände vor der Entstehung der Wanddurchbrechungen quellen die metachromatischen Körperchen ebenfalls leicht auf. In diesem Zustand sind sie wie die gequollenen Querwände mit Korallinsoda und Jod färbbar und halten Verdauungsfermenten gegenuber ebenfalls nicht stand. Ihre Auflösung zum Zwecke des Weitertransports als transitorische Reservebaustoffe erfolgt zur Zeit der Querwandporenbildung in den Hyphen.

5. Die Zellmembranen, die Fibrosin-, sowie die metachromatischen Korperchen scheinen den bisherigen Prufungen zufolge gleiche oder mindestens ganz ahnliche chemische Zusammensetzung zu haben. Ihre gleiche Veranderung im gequollenen Zustand, einerseits als Membran vor Entstehung der Querwandporen, andererseits als Fibrosin- und metachromatische Korperchen vor der Auflösung, sowie ihre nachträgliche Auflösung deuten ebenfalls auf Einheitlichkeit der chemischen Zusammensetzung hin. Die Substanz der Fibrosin- und metachromatischen Körperchen ware also, wie *Zopf* und *Molisch* schon vermuteten, Pilzmembranstoff. Die vorliegenden Untersuchungen nach der chemischen Richtung hin genugen aber nicht, genaue Angaben über die hier in Frage kommenden Stoffe zu machen. Auch gehen die Untersuchungsergebnisse, die von verschiedenen Autoren bisher über die Zellwandstoffe der Pilze gewonnen wurden, zum Teil sehr weit auseinander.

Literatur.

1) *Barret*, Bot. Gaz. 54, 356, 1912. — 2) *V. H. Blackman* u. *H. C. J. Frather*, Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 77, 354, 1906, Taf. 13—15.

3) *Crié*, C. r. 88, 759, 985, 1879. — 4) *E. M. Cutting*, Ann. Bot. **23**, 399, 1909. — 5) *F. Czapek*, Biochemie der Pflanzen. Bd. I. Jena, Verlag von Gust. Fischer, 1922.

6) *P. A. Dangeard*, Recherches sur le développement du périthèce chez les ascomycètes. Le Botaniste 9me, 10me sér. 1904—1907. — 7) *H. Delitzsch*, Zur Entwicklungsgeschichte der koprophilen Ascomyceten. *Lasiobolus pulcherrimus Crouan. Humaria anceps Rehm var. aurantiaca n. var. Sporormia leporina Niessl.* Inaug.-Diss. Leipzig 1926.

8) *L. Erréra*, L'épiplasme des Ascomycètes. Bruxelles 1882, S. 19.

9) *E. Foex*, C. r. 155, 661, 1912.

10) *R. A. Harper*, Jahrb. f. wissensch. Bot. **29**, 665, 1896.

11) *S. G. Jones*, Ann. Bot. **39**, 41, 1925.
12) *H. Molisch*, Mikrochemie der Pflanze, III. Aufl. Jena, Gust. Fischer, 1923, S. 395.
13) *N. Pringsheim*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **1**, 288, 1883.
14) *G. Ramlow*, Mycol. Centralbl. **5**, 176, 1914.
15) *Gg. Schweizer*, Zeitschr. f. Bot. **15**, 529, 1923. — 16) *Derselbe*, Planta, Arch. f. wissensch. Bot. **7**, 1, 1929. — 17) *Derselbe*, ebenda **12**, 4, 1931. — 18) *Derselbe*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **50**a, 14, 1932. — 19) *Derselbe*, diese Zeitschr. **7**, 297, 1936. — 20) *Derselbe*, Einführung in die Kaltsterilisationsmethode. Jena, Gust. Fischer, 1937. — 21) *R. Gr. Smith*, Centralbl. f. Bakt. II, **15**, 793, 1906.
22) *C. Ternetz*, Jahrb. f. wissensch. Bot. **35**, 273, 1900.
23) *E. J. Welsford*, New. Phyt. **6**, 156, 1907. — 24) *H. C. von Wisselingh*, Jahrb. f. wissensch. Bot. **31**, 224, 1897.
25) *A. Zopf*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **5**, 275, 1887.

Nachtrag.

Nach Abschluß vorstehender Abhandlung machte ich die unliebsame Wahrnehmung, die Ergebnisse zweier neueren Arbeiten unberücksichtigt gelassen zu haben. Soweit sich diese Befunde auf das Thema beziehen und zur Ergänzung desselben beitragen, seien dieselben hier noch erörtert. Es sind dies die Arbeit von *Adolf Jahn*, „Über Wachstum, Plasmaströmung und vegetative Fusionen bei *Humaria leucoloma Hedw.*" (Zeitschr. f. Bot. **27**, 193, 1934) und *Irmg. Kerl*, „Über Regenerationsversuche an Fruchtkörpern und andere entwicklungsphysiologische Untersuchungen bei *Pyronema confluens* (ebenda **31**, 129, 1937).

Jahn weist unter anderem besonders auf die plasmatischen Massenströmungen bei Humaria leucoloma hin, die auch schon in ganz jungen Hyphen festzustellen sind und auf endonomen und ektonomen Vorgängen beruhen. Das Plasma strömt in der ganzen Hyphenbreite. Die Hyphen sind durch Querwände in eine Reihe Zellen eingeteilt. Die Hyphenquerwände besitzen hier auch eine zentrale Öffnung, die dem Plasmastrom den Durchtritt gestatten. Je nach der Breite der Hyphen haben diese Septenöffnungen einen Durchmesser von 2 bis 10 μ. Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen sind auch die *Jahn*schen Befunde, daß die Septen erst in einiger Entfernung von den Hyphenspitzen angelegt werden und sich zuerst gegen die Hyphenmitte vorwölben. Die Querwandporenbildung ist im einzelnen schon innerhalb weniger Minuten vollendet. Der Plasmastrom wird durch die Querwandporen etwas behindert. Er kommt, worauf *Jahn* besonders hin-

weist, in seiner ganzen Breite an die Querwand und wird hier eingeengt. Der mittlere Strom kann ohne weiteres die Öffnung passieren, während der äußere gestaut wird. Vor der Septe entsteht eine Wirbelbewegung, die dem Hauptstrom entgegengerichtet ist. Hinter der Septe zeigt sich dasselbe Bild (durch Abb. 5 bei *Jahn* demonstriert).

Bei *Pyronema confluens* stellt *Irmg. Kerl* ebenfalls Querwandporen im Mycel fest, die auch schon *Bullet* 1933 beschrieben hat. *Kerl* schnitt einzelne Hyphenzellen aus dem Mycel heraus. Dabei verstopften sich die Zentralporen in den Querwänden, durch die im normalen Zellverband das Protoplasma gewöhnlich mit ziemlich erheblicher Geschwindigkeit frei durch die Zellzüge hindurchströmt, nach dem Anstechen der Nachbarzellen durch Plasmapfropfen. Bei der Regeneration der isolierten Zelle zu neuem Mycel wurde dann der kallusartige Pfropfen durch den sich aus dieser Zelle neu bildenden Mycelfaden nach außen zur Seite gedrängt, worauf dieser sich durch die Pore hindurchzwängte (*Kerl*, Abb. 1). Was die Entstehung der Fruchtkörper anbelangt, so stimmen die *Kerl*schen Befunde ebenso mit den meinigen überein. Die jüngsten Anlagen der Sexualorgane bilden ebenfalls knollenförmige Auswüchse am Mycel. Die Anlagezellen der Ascogone lassen schon deutlich die Trichogynen als dünne schlauchförmige Auswüchse bzw. Fortsätze erkennen. Die Basalmembran der Trichogyne ist aber noch nicht ausgebildet (*Kerl*, Abb. 2d und 2e). Die Querwand zwischen Trichogyne und Ascogon entsteht erst später, worauf *Kerl* in der Abb. 3a hinweist. Hier werden also auch in den Ascogonen — die Trichogynen sind mit inbegriffen — zunächst wie bei apandrischen Formen die Querwände bis zur Geschlechtsreife vollständig ausgebildet; erst dann entstehen zwecks Kernwanderung Wanddurchbrechungen. Die Querwandporen sind also auch nicht von Anfang an vorhanden.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über Bestrahlung von Chlorella vulgaris mit Röntgenstrahlen[1].

Von

Käthe Pietschmann.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. April 1937.)

Die Vererbungsforschung beschäftigt sich gegenwärtig im wesentlichen: 1. mit cytologischen Untersuchungen über den Feinbau der Chromosomen (*Caspersson*), 2. mit physiologischen über die Wirkungsweise der Gene im entwicklungsphysiologischen Geschehen (*Goldschmidt*, *Kühn* und Mitarbeiter), und 3. mit Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit des Verhaltens der Chromosomen in der Konjugationsphase durch äußere und innere Einwirkungen (*Oehlkers* und Mitarbeiter), eine Verbindung von Cytogenetik und Physiologie.

Bisher sind die Vererbungsforschungen in erster Linie an höheren Organismen in Angriff genommen worden. Indessen liegt es nahe, die Mikroorganismen in größerem Umfange als bisher einzubeziehen. Die Vererbungswissenschaft kann dadurch ganz allgemein neue Gesichtspunkte gewinnen, vor allem aber für zwei Grundprobleme, nämlich für die Physiologie des Zellkerns bzw. der genetischen Substanz (besondere Verhältnisse bei Bakterien und Cyanophyceen, rein vegetative Vermehrung bei Bakterien und gewissen Algen) und zweitens für die Physiologie der geschlechtlichen Differenzierung (Anfänge bei Pilzen und niederen Algen, *M. Hartmann* und Mitarbeiter). Zudem könnte bei der einfacheren Organisation der Mikroorganismen der Weg von Erbanlage zum verwirklichten Merkmal übersehbarer und leichter experimentell beeinflußbar sein als bei dem komplizierteren Entwicklungsgeschehen höherer vielzelliger Organismen.

Diese größere Einfachheit im Bau bringt allerdings einen gewissen Mangel an äußeren Merkmalen mit sich, der für das Experiment erschwerend ist. Jedoch gibt es auch bei Mikroorganismen wohlcharakterisierte Merkmale, die Untersuchungen über Vererbungsvorgänge aussichtsreich erscheinen lassen. Durch die geringe Größe der meisten mikrobiologischen Objekte sind für die cytologische Untersuchung allerdings besondere Schwierigkeiten gegeben, denen nur mit den besten optischen Hilfsmitteln zu begegnen sein wird. Seit durch den

---

[1] Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft).

Mikromanipulator getrennte Aufzucht einzelner Zellen und experimentelle Eingriffe an ihnen ermöglicht sind, ist eine wesentliche Vorbedingung für das Arbeiten mit Mikroorganismen erfüllt.

Versuchsergebnisse.

Material und Arbeitsverfahren.

Im folgenden wird über den Einfluß von Röntgenstrahlen auf die Teilungsvorgänge von *Chlorella vulgaris* berichtet. Diese Alge teilt mit Bakterien die Eigenschaft, sich, soweit bekannt, nur ungeschlechtlich zu vermehren, bietet aber ihnen gegenüber den Vorteil erheblicherer Größe und größerer Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen; ferner läuft die Zellteilung bei ihr bedeutend langsamer ab als bei Bakterien, so daß sich das anfallende Beobachtungsmaterial isolierungstechnisch leichter bewältigen läßt.

Soweit einzellige Algen bisher für Bestrahlungsversuche herangezogen wurden, geschah es, um ihre Strahlenempfindlichkeit, insbesondere auch bei verschiedenen Wellenlängen und im Vergleich zu anderen Objekten (Hefen, Bakterien, Zellen höherer Pflanzen), festzustellen. Die Schädigungskurve für Algen wurde in verschiedener Hinsicht untersucht (*H.* und *M. Langendorff* und *A. Reuss*). *Forssberg* verwendete für seine Versuche neben anderen Algen auch *Chlorella vulgaris*, die er von Prof. *Pringsheim*, Prag, bezog. Er stellte Untersuchungen über die Wirkung des Zeitfaktors an, indem er eine bestimmte Dosis in verschieden langen Zeiten gab. Die verschiedenen Wirkungen wurden durch Auszählen der abgestorbenen Algenzellen ermittelt. Er beobachtete bei den überlebenden bestrahlten Zellen eine „Zellteilungsverzögerung“ gegenüber den unbestrahlten Kontrollen. Die unbestrahlten Zellen waren zu bedeutend zellreicheren Kolonien herangewachsen als die überlebenden bestrahlten Zellen. Wie sich die Röntgenschädigung bei den Überlebenden und ihren Nachkommen auswirkt, wurde nicht näher untersucht.

Chlorella vulgaris läßt sich leicht in einer Nährlösung mit und ohne Agarzusatz züchten. Als Ausgangskultur diente für die Versuche eine Reinkultur, welche Herr Prof. *Pringsheim*, Prag, seinerzeit für andere Versuche freundlicherweise übersandt hatte. Von dieser wurden mit dem Mikromanipulator Einzellkulturen angelegt; die entstehenden Kolonien wurden auf Röhrchen abgeimpft, und auf diese Weise wurden verschiedene Klone erhalten.

Als Nährboden diente eine 0,25 %ige Lösung von *Liebigs* Fleischextrakt in einfach destilliertem Wasser mit Zusatz von 1,5 % Agar, der in der Regel bis zu 48 Stunden in fließendem Wasser gewaschen war, um ihn möglichst optisch rein zu machen; mit Soda wurde neutralisiert. *Chlorella vulgaris* wächst in Einzellkultur sehr gut und verträgt das Isolieren mit einer Mikropipette mit Hilfe des Mikromanipulators in der Regel ohne Schaden. Nur kurz nach dem Freiwerden aus der Mutterzelle scheinen die Zellen gegen diese Behandlung empfindlicher zu sein. Stärkeres Austrocknen des Agartropfens wird bei längeren Isoliermanipulationen nicht gut vertragen; beide Schädigungen sind aber vermeidbar.

Für die Bestrahlungen und die Kontrollen wurden von den in Röhrchen gezogenen Klonen etwa 2 bis 3 Tage vor der angesetzten Bestrahlung erneut Isolierungen auf Agarhängetropfen über Hohlschliffobjektträgern angelegt. Die entstehenden[1] 8- oder 16zelligen Kolonien wurden zur Hälfte für die Bestrahlung, zur Hälfte für die Kontrollen verwendet. Wenn ganze Kolonien zur Bestrahlung kamen, wurden Geschwisterkolonien für die Kontrollen genommen. Auf diese Weise kam möglichst gleich altes und gleich veranlagtes Material zur Verarbeitung. Die Zellen einer Kolonie wurden auf den Agarhängetropfen in solchem Abstand voneinander aufgebracht, daß die Tochterkolonien sich nicht berühren konnten; ihr Lageplan im Gesichtsfeld des Mikroskops wurde immer in einer Skizze auf einer Kartothekkarte festgehalten, auf welcher Herkunft und weiteres Schicksal der einzelnen Zellen vermerkt wurde. Nach den Kartothekkarten wurden jeweils die Stammbäume nachgetragen und nach den Stammbäumen die Statistik angefertigt.

Die Zellgenerationen folgen in an sich günstigen Zeitabständen aufeinander; die große Anzahl der Teilungsprodukte im Verlaufe mehrerer Generationen macht es aber technisch trotzdem unmöglich, alle Abkömmlinge weiter zu verfolgen. Es wurde bei dem in der Regel zweitägigen Teilungsrhythmus so verfahren, daß die Hälfte der Einzellpräparate an einem Tage durchgezählt, die andere Hälfte weiter vereinzelt wurde, während am nächsten Tage umschichtig gearbeitet wurde, wobei nachhinkende Teilungen mit zur Isolierung kamen. Neben deutlich veränderten Zellgenerationen wurden auch anscheinend normal gebliebene Stammbaumäste nicht außer acht gelassen, und unter Geschwistern wurden neben abnormen Teilungen auch normale isoliert. Trotz aller Bemühungen mußten die Isolierungen gegenüber dem Umfange des anfallenden Materials jedoch den Charakter von Stichproben behalten, was selbstverständlich den absoluten Wert der statistischen Bearbeitung beeinträchtigt.

Nachdem sich bei Vorversuchen herausgestellt hatte, daß bei einer Bestrahlung mit 30000 r[2] in 15 Minuten von den wenigen überlebenden Zellen höchstens noch zwei weitere Zellgenerationen zu erhalten waren, daß anderseits eine Dosis von 10000 r in 5 Minuten schon eine deutliche Schädigung ergab[3], wurden in den hier verarbeiteten Versuchen jeweils 10000 r verabfolgt. Im ersten Versuch lagen folgende physikalische Bedingungen vor: 100 kV, 4 Milliamp., Grenzwellenlänge 0,124 Å, gefiltert mit Nickelfokusblech von 0,5 mm Halbwertsschicht = 0,35 mm Cu, Fokusabstand 0,5 cm. Dosis: 10000 r in 5 Minuten; in den übrigen Versuchen herrschten die folgenden Bedingungen: 90 kV = 158 Volt am Schalttisch, 4 Milliamp., Grenzwellenlänge 0,137 Å, gleiche Filterung, Fokusabstand 1,8 cm. Dosis 10000 r in $9^1/_4$ Minuten. Im letzten Versuch wurden fünf

[1] Eine Zelle von *Chlorella* teilt sich („Mutterzelle") unter den hier eingehaltenen Versuchsbedingungen normalerweise in 8 oder 16 Tochterzellen, die eine 8er- oder 16er- „Kolonie" und die erste „Generation" darstellen. Die Tochterzellen entstehen innerhalb der Mutterzelle in 3 bzw. 4 „Teilungsschritten", womit nichts darüber ausgesagt werden soll, ob jeder Kernteilung unmittelbar eine Plasmateilung folgt, oder ob die Kernteilung vor der Aufteilung des Plasmas durchgeführt wird (freie Zellbildung). — [2] r hier und im folgenden = Röntgeneinheiten. — [3] *Forssberg* bestrahlte *Chlorella* mit 5000 r, die übrigen Algen mit 10000 r.

Präparate mit je 16 Zellen unter den an zweiter Stelle geschilderten Bedingungen in Abständen von je 3 Stunden bestrahlt, während die sechste 16er Geschwisterkolonie als Kontrolle diente. Die Bestrahlungen wurden in der Universitäts-Frauenklinik, Direktor Prof. *Martius*[1], ausgeführt, und zwar mit der Apparatur, die im übrigen therapeutischen Zwecken diente. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen immer auf dem Agar belassen, und erst nach erfolgter Teilung wurden die Tochterzellen auf neuen Agartropfen vereinzelt. Waren wenigzellige Kolonien gebildet, so wurden gelegentlich auf einem Agartropfen mehrere Kolonien räumlich voneinander getrennt vereinzelt. Blieb bei einer Zelle die erste Teilung nach der Bestrahlung sehr lange aus, so wurde sie zur Prüfung ihrer Lebensfähigkeit auf neuen Agar gebracht; meist ist aber eine Schädigung ohne weiteres erkennbar. Die Hangetropfenpräparate wurden in feuchten Kammern bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Deckgläser wurden mit Wasser an den Objektträgern befestigt. Diese wurden, um Platz zu gewinnen, mit Plastilin in Gruppen bis zu fünf übereinander gekittet; ein Einfluß von Belichtungsunterschieden auf die Grünfärbung der Algen wurde dabei nicht beobachtet. Direktem Sonnenlicht waren die feuchten Kammern nicht ausgesetzt (Nordfenster).

Im Laufe der Untersuchungen wurde dreierlei Material gewonnen: erstens bestrahltes, das von der Bestrahlung ab bis im Höchstfalle zur 22. Generation in Einzellkulturen weitergeführt wurde, zweitens unbestrahltes Kontrollmaterial, im Höchstfalle bis zur 20. Zellgeneration weitergeführt, und drittens als „vorbestrahlt" bezeichnete Klone, die von einem bestrahlten Klon abstammten (Näheres unten).

Insgesamt kamen 13278 „Fälle" zur statistischen Behandlung. Diese Zahl umfaßt die Häufigkeit des Vorkommens von den hier als „normal" anzusehenden 8er und 16er und den abnormen Teilungen, das Heranwachsen ohne nachfolgende Teilung und das Absterben ohne Heranwachsen: nicht in ihr enthalten sind die für die sichere Zellenzählung ausfallenden, weil zu weit entwickelten Kolonien, ferner die wegen starken „Verklumpens" nicht auszählbaren Teilungsfälle und die technisch verunglückten.

Von diesen 13278 Fällen entfallen 6168 Fälle aus 10 Zellgenerationen auf die Bestrahlten, 1010 Fälle aus 5 Generationen auf die Vorbestrahlten und 6100 Fälle aus 20 Generationen auf die unbestrahlten Kontrollen. Es wurden sowohl jeder Stammbaum für sich behandelt, als auch entsprechende Zellgenerationen aller Klone der gleichen Materialgruppe. Aus den Einzelstammbäumen sind individuelle Unterschiede, ferner bewußte Selektion hinsichtlich veränderter oder normaler Teilungszahlen deutlich erkennbar.

[1] Für das bereitwillige Entgegenkommen, die Bestrahlungen trotz starker Inanspruchnahme der Röntgenabteilung zu wiederholten Malen einzuschieben, sei Herrn Prof. *Martius*, dem Physiker der Klinik Herrn Dr. *Witte* und der Röntgenassistentin Frl. *Braun* herzlich gedankt.

Das bestrahlte Material umfaßt neun Klone; davon wurden in den Verteilungskurven (Abb. 8 bis 10) 10 Zellfolgen verwertet, obwohl manche Klone noch weitere Zellgenerationen hindurch isoliert wurden, um zu beobachten, ob ein Abklingen der Schädigung zu bemerken wäre. In diesen 10 Generationen sind ebenso viel Teilungsfälle zur Beobachtung gelangt wie in den 20 Generationen des Kontrollmaterials. Auch deshalb wurden die weiteren Generationen nicht mit in die Statistik einbezogen. Die einzelnen Zellgenerationen setzen sich zusammen aus:

1. Zellgeneration	9 Klone	mit	218	Teilungsfällen
2. „	9 „	„	529	„
3. „	9 „	„	1057	„
4. „	9 „	„	1210	„
5. „	9 „	„	1275	„
6. „	8 „	„	1045	„
7. „	6 „	„	382	„
8. „	3 „	„	265	„
9. „	2 „	„	172	„
10. „	2 „	„	158	„
			6311	Teilungsfälle.

Abzüglich der 143 für die Verteilungsverhaltnisse nicht auswertbaren verbleiben 6168 Fälle.

Das vorbestrahlte Material stammt von einem Klon ab, der am 15. Februar 1934 in 5 Minuten 10000 r erhalten hatte. Am 29. Mai 1934 wurden die Hängetropfenisolierungen unterbrochen: die teils normalen, teils abnormen Nachkommen von fünf 8er-Kolonien wurden zusammen auf ein Röhrchen abgeimpft; sie stellten die 21. und 22. Zellgeneration dieses Stammbaumes dar. Die Geschwister dieser fünf 8er-Kolonien waren auch abnorm in ihrem Teilungsverhalten gewesen. Am 19. Februar 1936 wurden von einer (am 9. Dezember 1935 angelegten) Weiterimpfung des Röhrchens erneut Einzellpräparate auf Agarhängetropfen hergestellt und weiter isoliert gezogen. Dieses als „vorbestrahlt" bezeichnete Material umfaßt in fünf Zellgenerationen:

1. Zellgeneration	11 Klone	mit	124	Teilungsfällen
2. „	9 „	„	382	„
3. „	7 „	„	296	„
4. „	5 „	„	142	„
5. „	3 „	„	70	„
			1014	Teilungsfälle.

Abzüglich der 4 für die Verteilungsverhältnisse nicht auswertbaren verbleiben 1010 Fälle.

Als Kontrollmaterial wurden insgesamt 22 Klone gezüchtet. Die Anzahl der Klone und der Teilungsfälle war in den einzelnen Zellgenerationen folgende:

1.	Zellgeneration	22	Klone	mit	319	Teilungsfällen
2.	,,	10	,,	,,	557	,,
3.	,,	10	,,	,,	417	,,
4.	,,	9	,,	,,	448	,,
5.	,,	7	,,	,,	462	,,
6.	,,	7	,,	,,	454	,,
7.	,,	6	,,	,,	467	,,
8.	,,	5	,,	,,	331	,,
9.	,,	3	,,	,,	368	,,
10.	,,	3	,,	,,	403	,,
11.	,,	2	,,	,,	418	,,
12.	,,	2	,,	,,	243	,,
13.	,,	2	,,	,,	261	,,
14.	,,	2	,,	,,	322	,,
15.	,,	1	Klon	,,	223	,,
16.	,,	1	,,	,,	155	,,
17.	,,	1	,,	,,	172	,,
18.	,,	1	,,	,,	133	,,
19.	,,	1	,,	,,	58	,,
20.	,,	1	,,	,,	48	,,
					6259	Teilungsfälle.

Abzüglich der 159 für die Verteilungsverhältnisse unverwertbaren verbleiben 6100 Fälle.

Die Photogramme wurden nach Neuisolierungen von den auf Röhrchen weitergezogenen bestrahlten und unbestrahlten Klonen hergestellt, und zwar wurden die Hohlschliffobjektträgerkulturen meist direkt photographiert. Um die Kondenswassertröpfchen im Hohlschliff möglichst aus dem Bild auszuschalten, wurde mit einer der Objektivapertur ungefähr gleichen Apertur beleuchtet. In den Fällen, wo die Tröpfchen zu sehr störten, wurden die Deckgläser auf einen planen Objektträger mit Glasring für die Zeit der Aufnahme übertragen. Verwendet wurden die *Zeiss*-Apochromate 10× n. Ap. 0,30 und 20× n. Ap. 0,65 in Verbindung mit dem Homal 3.

Cytologische Untersuchungen über die normale und die abgeänderte Teilung konnten bisher leider noch nicht in befriedigender Weise in Angriff genommen werden, obgleich sie unerläßlich sind, um ein sicheres Urteil über die Art der hier vorliegenden Röntgenschädigung zu gewinnen. Es handelt sich bei *Chlorella* um sehr kleine Kerne, etwa in der Größe des Hefekerns. Für diese Untersuchungen könnte die Ultraviolett-Mikrophotographie nach *A. Köhler*[1] mit Vorteil angewendet werden, nicht nur für Aufnahmen von fixiertem und gefärbtem Material wegen der besseren Auflösungsbedingungen, sondern vor allem für Serienaufnahmen an heranwachsenden und sich teilenden Zellen in lebendem bestrahlten und unbestrahlten Material. Die spezifische Ultraviolettabsorption der Nukleinsäuren des Chromatins würde schon am lebenden Objekt die Kerne ohne Färbung zu erkennen gestatten (*Caspersson*, *Oehlkers*).

[1] Die Beschaffung der Apparatur war dem Institut bisher leider noch nicht möglich.

Allgemeine Beobachtungen an normalem, unbestrahltem Material.

Chlorella vulgaris hat ihren Namen von *Beijerinck* erhalten, der zuerst die Alge eingehender untersucht hat. Nach ihm hat sich *Grintzesco* mit ihr beschäftigt; seine Abbildungen haben weitere Verbreitung gefunden (*Strasburgers* Lehrbuch, *Paschers* Süßwasserflora). Nach *Beijerinck* soll der Chromatophor mit der Teilung beginnen, indem er nacheinander in 2, 4, 8, 16 Teilstücke auseinanderfalle. Zugleich vermehre sich der Kern, und das farblose Protoplasma scheine sich dem Teilungsprozeß ebenfalls anzuschließen, so daß man schließlich 16 sehr kleine Zellen innerhalb der Zellhaut der Mutterzelle beobachten könne. Als Abweichungen von diesem regelmäßigen Vermehrungsgange finde man ein Ausbleiben irgendeines der Produkte der 2-, 4- oder 8-Teilung und weit seltener eine „Vermehrung durch Abschnürung“. Auf Einzelheiten geht *Beijerinck* nicht ein.

An Zellen, die in Salzwasser gewachsen waren, konnte *Beijerinck* den Zellkern sehen; an gewohnlichen Zellen ist er nicht mit Sicherheit zu erkennen, wie auch *Grintzesco* angibt. Wegen der Färbbarkeit mit sogenannten Kernfarbstoffen wurde das beobachtete Körperchen als Kern angesprochen. Nach *Beijerinck* sollen nicht selten zwei oder drei Kerne in einer Zelle vorkommen; auch *Grintzesco* fand gelegentlich zwei Kerne und stellte fest, daß 2-, 4- oder 8-Teilung vorkam, je nachdem, was für ein Nahrboden gewählt war. Die 16er-Teilung, die *Beijerinck* als Regel angibt, hat *Grintzesco* nur selten beobachtet, was er mit dem andersartigen Nahrboden erklaren mochte. Seine Abbildungen geben die Belege für 2er-, 4er- und 8er-Teilung: in seiner Abb. 4, wo die 8er-Teilung in sechs Stadien gezeichnet ist, fallt an 4e auf, daß 10 Zellen gezeichnet sind; moglicherweise ist in dem Material also doch haufiger die 16er-Teilung vorgekommen und dem Autor nicht aufgefallen. Nach *Beijerinck* soll bei sehr günstiger Ernahrung in flüssigem Nährmedium die Zellteilung auf jeder Stufe der von ihm behaupteten Zweiteilung unter sukzessivem Wachstum vor sich gehen, wodurch gewohnlich schon bei der zweiten Teilung die Zellhaut der Mutterzelle gesprengt werde. Auch im Körper von *Protozoen* soll *Chlorella* vier Zellen bilden. *Grintzesco* findet bei günstigen Bedingungen zunächst 8er-Teilung, spater sinkt die Vermehrung auf 4er- und weiter auf Zweiteilung. Dann findet der Übergang zu einer latenten, gegen Austrocknen recht unempfindlichen Lebensform statt.

Forssberg hält seine Kulturen bei 23° C und täglich achtstündiger künstlicher Belichtung. Das Teilungsintervall soll 24 Stunden betragen. Wieviel Zellen aus der Mutterzelle frei werden, ist nicht angegeben. Bei den eingehaltenen Versuchsbedingungen wurden, wie seine Tabelle III (1933, S. 403) zeigt, im Höchstfalle 14 Zellen von den die Bestrahlung überlebenden *Chlorellen* gebildet, wahrend die Kontrollen in derselben Zeit etwa 50 Zellen je Kolonie zahlen sollen.

Die neueste Arbeit über *Chlorella* von *Pearsall* und *Loose* erweckt einige Zweifel, ob den Verfassern tatsächlich *Chlorella vulgaris* in Reinkultur vorgelegen hat. Sie beschreiben fünf verschiedene, aufeinanderfolgende Stadien. Bei dem jüngsten Stadium (100 Zellen je cmm Kulturflüssigkeit) soll das Protoplasma aus der Mutterzelle frei werden und sich in 4 bis 16 Plasmapartien teilen, die amöboid zu sein scheinen. An dieses Stadium schließt sich dasjenige mit 2er- und 4er-Teilungen. Wenn mit zunehmendem Alter der Kultur die Membran fester werde, käme es zur 8-Zellenbildung, da die Teilprodukte nicht früher frei werden könnten. Im Stadium 3 (6000 Zellen je cmm) werden nach den Verfassern 4 und 8 Zellen gebildet.

Für Stadium 4 werden 8 und 16 Zellen, diese als selten, beschrieben; ferner sollen auf diesem Stadium in geringer Anzahl Schwärmer auftreten; von diesen Schwärmern sollen mindestens bis zu 30 aus einer Zelle hervorgehen; sie sollen zwei Geißeln haben. Stadium 5 weist vakuolisierte Zellen, ähnlich den älteren Zellen höherer Pflanzen, und Teilungsschübe in Abständen von 2 Tagen auf. Bewegliche Schwärmer und amoboide Zellen sind m. W. sonst nicht bei *Chlorella vulgaris* beschrieben worden. Der Angabe stehen die Angaben von *Beijerinck* und *Grintzesco* gegenüber, die ausdrücklich betonen, daß sie keine beweglichen Zellen beobachten konnten. Sie versuchten, den damaligen Möglichkeiten entsprechend, möglichst Einzell-

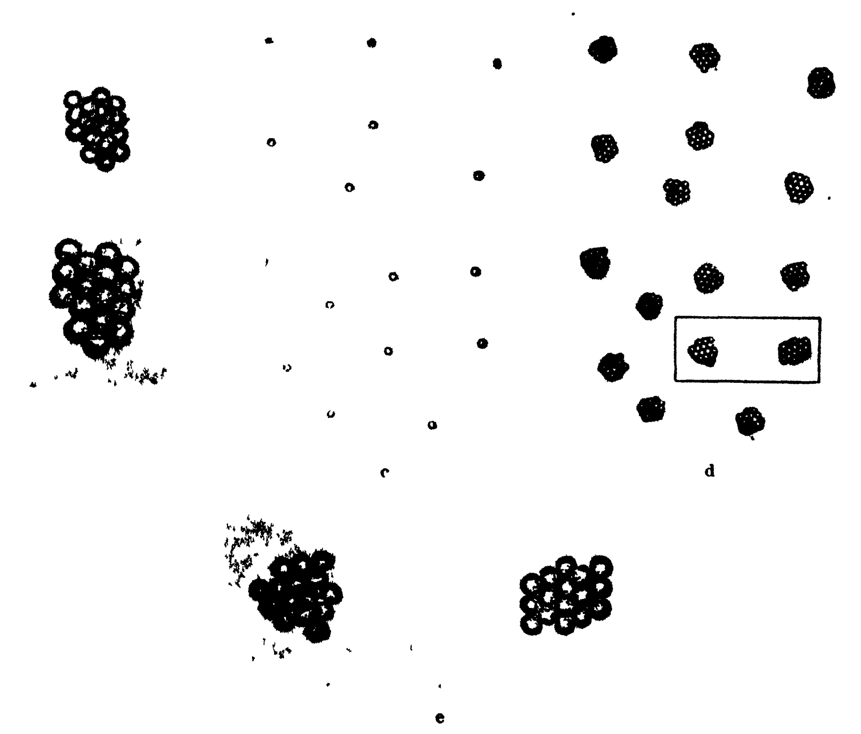


Abb. 1. Unbestrahlt. a 16er-Kolonie, etwa 24 Stunden alt. 312mal. b Dieselbe Kolonie 22 Stunden später. 312mal. c Dieselbe Kolonie, isoliert. 108mal. d Dieselbe Kolonie 24 Stunden später. 108mal. e Mittlere (15er) und rechte (16er) Kolonie der zweituntersten Reihe, 1/4 Stunde später. 312mal.

beobachtungen anzustellen, während *Pearsall* und *Loose* ihre Angaben anscheinend in der Hauptsache auf Stichproben aus Kölbchen- oder Röhrchenkulturen gründen und der Unbequemlichkeit, mit wenigen Zellen zu arbeiten, aus dem Wege gegangen sind.

Bei den in dieser hier vorliegenden Arbeit eingehaltenen Versuchsbedingungen ergab sich folgendes:

Chlorella vulgaris bildet in Einzellkultur auf *Liebig*-Agar oder in *Liebig*-Lösung unter den ihr zusagenden Bedingungen normalerweise

8 oder 16 Tochterzellen (Abb. 1a und 2a). Die Teilungsfreudigkeit bleibt monatelang gleich, wenn man die Tochterzellen jedesmal auf einem neuen Agartropfen vereinzelt. Läßt man sie auf dem gleichen Tropfen sich weiter entwickeln, so wächst eine große, makroskopisch sichtbare, schön grün gefärbte, vielzellige und vielschichtige Kolonie heran, die sich leicht auf Röhrchen abimpfen läßt (Abb. 3d). In ihrem

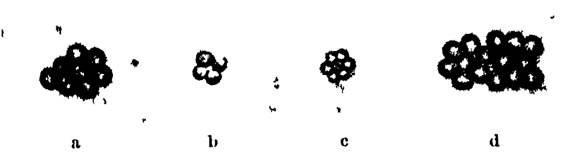


Abb 2. a unbestrahlt, b bis d bestrahlt a Normale 8er-Kolonie, etwa 24 Stunden alt. 312 mal b 4er-Kolonie. 332 mal. c 7er-Kolonie, kurz nach der Teilung. 356 mal. d 15er-Kolonie mit großer Zelle (zweite Zelle von rechts in der mittleren Reihe) 308 mal

Wachstum auf dem Agartropfen ist sie natürlich, wie jede Kolonie eines Organismus, begrenzt. Die Teilungen erfolgen offenbar sehr regelmäßig; denn die

a b c

d

Abb. 3. a bis c bestrahlt, d unbestrahlt. a 15er-Kolonie mit großer Zelle. 308 mal. b Isoliert; die große Zelle liegt in der dritten Querreihe rechts außen. 76 mal. c Dieselbe Kolonie geteilt und zum Zählen vorbereitet. Die dicke Zelle hat 28 gebildet. In der zweituntersten Querreihe rechts außen 15er-Kolonie, sonst 16er-Kolonien. 90 mal. d 15er-Kolonie, isoliert und zu Tochterkolonien ausgewachsen; die größte Kolonie entspricht der großen 15er-Zelle. Die Gleichzelligkeit der Kolonien ist zu beachten. 61 mal.

Zellen sind bis auf ganz geringe Ausnahmen, wo einmal eine besonders große Zelle zu sehen ist, durchweg von gleicher mittlerer Größe. In Röhrchenkultur, die etwa alle Monat übergeimpft wurde, trifft man dagegen auch dickwandigere und ungleich große, also ungleich alte Zellen an. Die Teilungsfähigkeit wird geringer; es treten Viererteilungen auf, was auch *Grintzesco* beschreibt. Bei Erstisolierungen aus Röhrchenkulturen, ferner in älteren Hängetropfenkolonien und in bestrahltem Material kam Viererteilung auch im vorliegenden Material und auch auf Agartropfen zur Beobachtung, jedoch selten (Abb. 2b, 6d). Die Regel bei gut gedeihendem Material auf Agarhängetropfen ist die 8er- und 16er-Teilung.

Ein bestimmter Rhythmus in der Aufeinanderfolge von 8er- und 16er-Teilung konnte nicht aufgefunden werden: mehrere Zellgenerationen hintereinander können nur 8er- bzw. nur 16er-Teilungen erfolgen, oder aber 8er- und 16er-Teilungen wechseln anscheinend regellos miteinander ab. Das Verhältnis von 8er- zu 16er-Teilungen ist auch unter Geschwistern wechselnd. Das gilt sowohl für das Wachstum auf flussigem wie auf festem Nahrsubstrat. Indessen ist es durchaus möglich, daß die Aufdeckung eines vielleicht längerfristigen Rhythmus dadurch verhindert wird, daß nicht alle Teilprodukte Generationen hindurch verfolgt werden konnten. Im allgemeinen vollzieht sich die 8er-Teilung in kurzerer Zeit als die 16er-Teilung Die Kolonien von ursprünglichen 8er-Teilungen können nach 3 bis 4 Tagen ebenso groß und zellenreich geworden sein wie die Kolonien, deren Stammzelle sich zuerst in 16 teilte. Daher ist man auch gezwungen, spatestens am zweiten Tage nach erfolgter Teilung die Teilprodukte zu zählen, wenn das Material nicht fur die statistische Behandlung unbrauchbar werden soll.

Unmittelbar nach der Teilung liegen die Zellen meist noch nicht alle so ubersichtlich in einer Ebene auf dem Agar wie nach einigem Heranwachsen innerhalb von 24 Stunden, hierbei platten sich die innenliegenden Zellen an den Beruhrungsflächen sechskantig gegeneinander ab, um die Zellgruppe herum sieht man oft deutlich einen Flüssigkeitshof, der durch Synarese aus dem Agar entstanden ist (Abb. 1e, S. 187, Abb. 5b, S. 192). Wiederholt mußte zum Zwecke des genauen Zahlens öfters allerdings nur bei bestrahltem Material (Abb. 3c, S. 188) - mit der Kapillare des Mikromanipulators die Kolonie zur Lagerung in einer Ebene gebracht werden: dazu genugt gewöhnlich die Berührung des Agars in der Nähe der Kolonie und vorsichtiges Ausblasen der dabei in die Kapillare eingedrungenen Synaresefluss igkeit. Zuweilen findet man noch ein kleines Kügelchen bei den Tochterzellen, von dem man nicht mit Sicherheit sagen kann, was es ist. Für die Deutung als Richtungskörper ist kein Anhalt gegeben, da ja geschlechtliche Fortpflanzung bei *Chlorella* nicht bekannt geworden ist. Die Annahme, daß es sich um einen bei der Aufteilung in die Tochterzellen beiseite gelassenen Plasma-

rest handelt, wie er übrigens nach *Küster* ein Anzeichen für „freie Zellbildung" sein soll, hat wohl einstweilen, solange die cytologische Untersuchung aussteht, die größte Wahrscheinlichkeit für sich.

Das Freiwerden der Teilprodukte aus einer Mutterzelle wurde im flüssigen *Liebig*-Hängetropfen verfolgt. Einer normalen Zelle ist es erst kurz vor dem Platzen anzusehen, ob sie in 8 oder 16 Tochterzellen aufgeteilt wird. Im unbestrahlten Material kann man bei Geschwisterzellen beobachten, daß sich zunächst die Zellen teilen, die 8 Tochterzellen liefern, während diejenigen, die 16 Tochterzellen liefern, $^1/_2$ bis 1 Tag später geteilt sind. Daß *Beijerinck* und *Grintzesco* Zellen in Zweiteilung und Vierteilung gefunden haben und dieses für die normalen Stufen der Teilung in 8 und 16 Tochterzellen halten, läßt sich wohl damit erklären, daß sie Zellen aus Massenkulturen vor sich hatten, wo die Teilungsfreudigkeit bereits zurückgegangen war. Im vorliegenden Material hatte ja bei der steten Kontrolle der isolierten Zellen zu verschiedenen Tageszeiten das gleiche zur Beobachtung gelangen müssen. Weil hier den Zellen nur Größenwachstum, aber keine innere Aufteilung des Plasmas anzusehen war, war es auch nicht möglich, 8er- oder 16er-Mutterzellen auszusuchen und auf bestimmter Teilungsstufe zu bestrahlen. Daß erst kurz vor dem Platzen deutlich wurde, wieviel Tochterzellen entstanden waren, legt den Gedanken nahe, daß erst die Kernteilung stattfindet und die Plasmateilung nachfolgt, wofür nach *Küster* auch der oben erwähnte kleine Plasmarestkörper sprechen würde.

Das hier zu beschreibende Präparat enthielt 8 Zellen, die bei 320facher Vergrößerung anfangs kleine Körnchen aufwiesen, die im Verlauf von 1 bis $1^1/_2$ Stunden heranwuchsen, so daß die Zelle mehr davon erfüllt erschien: die Zelloberfläche wurde bucklig. In der bläulichgrünen Zelle sah man stark lichtbrechende Körnchen. Bei 170facher Vergrößerung glaubte man die Einteilung des Plasmas zu sehen, an der Zelloberfläche erschien sie streckenweise als epithelartige Felderung. Die ganze Zelle war in *Brown*scher Molekularbewegung, im Zellinnern herrschte Ruhe. Die Tochterzellen wurden durch ein explosionsartiges Platzen der Mutterzelle frei und gerieten durch *Brown*sche Bewegung auseinander. Der Rest der Mutterzellhülle war nicht stark lichtbrechend und leicht zu übersehen, jedenfalls nicht membranartig scharf konturiert. Die 8 Zellen teilten sich in diesem Falle fast gleichzeitig alle in 16. Während hier nur die letzten $1^1/_2$ Stunden vor dem Freiwerden beschrieben werden, gibt die Abb. 1, S. 187, die Entwicklung einer 16er-Gruppe und ihrer Nachkommen.

Abweichungen im unbestrahlten Material.

Im unbestrahlten Material kommen von 8 und 16 abweichende Teilungszahlen vor. Zeichnet man die Häufigkeitsverteilung der Zellanzahlen für die einzelnen Klone gesondert, so fallen nur zwei durch

stärkere Abweichungen auf, während die übrigen gut miteinander übereinstimmen. Durchschnittlich kommen dabei nur 7er- und 15er-Teilungen als Abweichungen vor (Abb. 1e, links, S. 187). Hiermit hängt anderseits das Auftreten von höheren Teilungszahlen zusammen; in den 7er- und 15er-Kolonien fällt in der Regel eine Zelle durch ihre besondere Größe auf: diese liefert dann bei der nächsten Teilung, und zwar ohne hinter ihren Geschwisterzellen nachzuhinken, gewöhnlich 32 Zellen. Wenn nur 16 entstehen, so entsprechen sie wohl zwei 8er-Teilungen; diese Doppelwertigkeit der Zelle ist dann nicht erkennbar. Vielleicht handelt es sich bei *Beijerinck*s und *Grintzesco*s zweikernigen Zellen um diese Formen.

In den abweichenderen Klonen wurden auch 24, 26, 29, 30 und 31 Zellen, ja sogar 40 und 48 Zellen gezählt. Die große Zelle hat in diesen Fällen die Fähigkeit, ein Mehrfaches von 8 oder 16 oder eine Kombination aus 8 und 16 Zellen zu liefern. 24 Zellen sind dann aus 8 + 16 entstanden. Die Bildung von 48 ließ sich in dem betreffenden Fall folgendermaßen erklaren: aus einer Zelle waren 13 Zellen entstanden, die zwölfmal 16 und einmal 48 ergaben; diejenige Zelle, welche sich in 48 teilte, entsprach der 13. bis 16. Zelle, so daß sie als zweimal 8 und zweimal 16 = 48 Zellen aufzufassen sein dürfte. Unter 30 Zellen sind gelegentlich 2 große, unter 31 Zellen 1 große Zelle zu sehen, die zwei normal großen entsprechen.

Daß aus einer großen Zelle unerwartet wenig Zellen hervorgingen, ereignete sich bei einer großen 7er-Zelle, sie ergab nur 4, im weiteren Verlauf der Generationen folgten 8er und 16er.

Wie schon erwähnt wurde, kamen die Teilungszahlen außer 7, 8, 15, 16 und 32 nur in den beiden abweichenden Klonen vor. Die Ursache des Abweichens ist bei dem einen bekannt: nur *ein* Zweig des Stammbaumes dieses Klons weist uberhaupt abnorme Zahlen auf, und das ist der Zweig, der von einer 8er-Kolonie seinen Ursprung nimmt, fur die beim Isolieren vermerkt wurde, daß das Praparat „zu trocken" geworden sei. Hierdurch kam offenbar eine Schadigung zustande, die sich in starken Teilungsabweichungen äußert, und zwar wurden weniger Zellen als normal gebildet, häufig mit nachfolgendem Ausgleich durch Bildung einer höheren Anzahl von Tochterzellen bei der nachsten Teilung. Außer 7 und 15 werden hier zwischen 8 und 16, 16 und 32 liegende Zahlen verwirklicht, außerdem auch 4 und 6.

Der zweite abweichendere Klon neigte zu „Verklumpen" der Teilprodukte, d. h. die Tochterzellen trennen sich nach dem Platzen der Mutterzellmembran alle oder zu mehreren nicht vollständig voneinander. Die verklumpten Tochterzellen sind oft schwer auszählbar. Auch beim Weiterwachsen bleiben sie oft ungetrennt. Im extremsten Falle wachsen sie ungleichmäßig schnell heran. Vielleicht ist diese Anomalie gemeint, wenn *Beijerinck* von Vermehrung durch „Ab-

schnurung“ spricht, da hier zuweilen kleine und große Zellen im Haufen zusammenliegen (Abb. 4 und 5). Es kommen auch wiederholt nur 4er-Teilungen vor, und zwar in der Weise, daß z. B. 15 + 4 kleine Zellen statt 16, oder 4 große + 16 kleine statt 8, oder 7 große + 4 kleine statt 8, oder 3 große + funfmal 4 = 20 kleine statt 8 gefunden werden. Auch kommen kleine, mittlere und große Zellen nebeneinander vor, man hat dann verschiedene Zellgenerationen nebeneinander vor sich.

Wahrend bei der Bildung von uber 16 Zellen das Nachholen eines ausgebliebenen Teilungsschrittes, wenn nicht

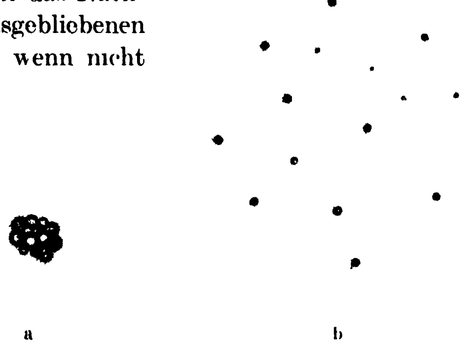


Abb. 4. Unbestrahlt, abweichender Klon. a Kolonie aus 15 Zellen, darunter 4 kleine. 204mal. b Diese 15 Zellen isoliert. 102mal.

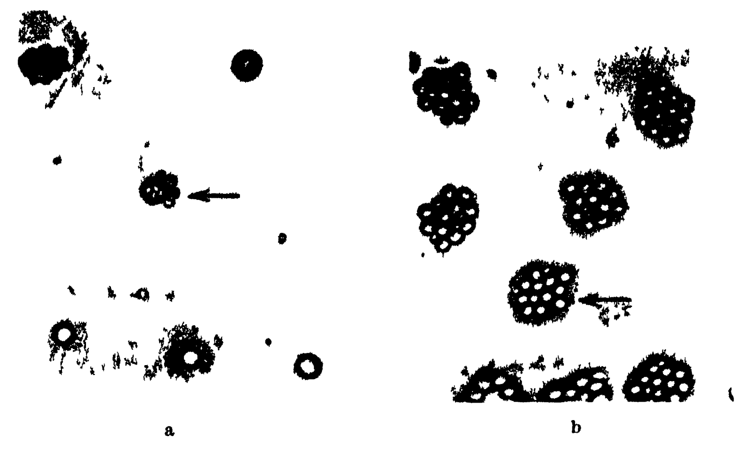


Abb. 5. Unbestrahlt, abweichender Klon. a Verklumpen bei der Teilung. 280mal. b Nach vollendeter Teilung. 188mal. Synaeresefl ussigkeit um die ungleichzelligen Kolonien. Bildausschnitt etwas großer als bei a.

des Kernes, so doch mindestens des Plasmas, vorzuliegen scheint, entstehen Viererzellen beim Vorauseilen in der Teilung. Es handelt sich jedenfalls nicht um ein Erschopftsein der Teilungsfahigkeit, denn aus den Viererzellen entstehen weiter 8er und 16er.

In einem anderen Falle entstanden aus einer besonders kleinen 8er-Zelle nur 4; aus den normal großen Geschwisterzellen dagegen einmal 32, einmal 15, dreimal 8, einmal 7 + 4 kleine (= 8), einmal 7 Zellen. Es war wohl eine Verschiebung von Zellmaterial zugunsten der 32 liefernden und zuungunsten der 4 liefernden Zellen schon in der Mutterzelle dieser Geschwister vorgekommen.

Bei diesem eben beschriebenen abweichenden Klon ist durch Selektion das gehäufte Auftreten Abnormer herbeigeführt worden, denn aus der dritten Generation einer normalen Kontrollisolierung wurde nur *eine* verklumpte 16er-Gruppe weitergezogen, die dann die beschriebenen Abweichungen in ihrer Nachkommenschaft aufwies. Ob das Verklumpen auch durch Trockenwerden verursacht wird, oder ob eine andere Schadigung sich ereignet hatte, ist mir nicht bekannt; die Ursache des „Verklumpens" blieb unklar.

Diese beiden abweichendeıen Klone haben jedoch einen wesentlich niedrigeren Prozentsatz an Abweichungen als das bestrahlte Material im Durchschnitt, nämlich 16,7 %, ohne diese beiden Klone beträgt der Prozentsatz Abnormer in den Kontrollen nur 1,55 %, berechnet für alle Kontrollklone einschließlich der beiden abweichenden 5,28 %. (Die Bestrahlten haben durchschnittlich 29,05 %, die Vorbestrahlten 27,2 % Abnorme gebildet.)

Die Bildung von 7 oder 15 Zellen mit einer besonders großen Zelle liegt anscheinend noch im Rahmen des „Normalen", wenn diese ausgebliebene Teilung bei der folgenden Teilung nachgeholt wird.

Die Haufigkeitsverteilung für die verschiedenen Zellanzahlen, die bei der Teilung im unbestrahlten Material entstehen, ist in Abb. 8, S. 197, und in vergroßertem Maßstabe in Abb 9, S. 198, dargestellt (punktierte Kurve). Die Gesamtanzahl der beobachteten Teilungsfälle ist gleich 1 gesetzt. Die Hauptgipfel der Kurve liegen bei 8 und 16: sie sind rechtsseitig asymmetrisch. Diese Asymmetrie entsteht dadurch, daß Zellanzahlen nahe unter 8 und unter 16 häufiger vorkommen als nahe über 8 und uber 16. Kleinere Gipfel liegen bei 32, ferner – infolge der beiden abweichenderen Klone bei 12, 10 und 4. Die Zahlen zwischen 16 und 32 werden selten verwirklicht. Die Haufigkeitsverteilung für die beiden abweichenderen Klone gesondert gezeichnet, zeigt einen allmählicheren und höheren Anstieg zwischen 4 und 8 bzw. 8 und 16, bei dem einen entsprechend der häufigeren 8er-Teilung vor 8, bei dem anderen vor 16.

Außer der Häufigkeitsverteilung ist (in Abb. 10, S. 199) die Kurve wiedergegeben, die zeigt, wie sich das Verhältnis aller Abnormen zur Summe der 8er + 16er im Laufe der Generationen darstellt. Die Kurve hat in der 7. Generation einen Gipfel. Dieser ist dadurch hervor-

gerufen, daß in der 6. Generation in dem einen abweichenden Klon mehr 14er- und 15er-Teilungen vorkommen, denen weitere 15er- und 32er-Teilungen in der 7. Generation folgen.

Das bestrahlte Material.

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Abweichungen kommen auch im bestrahlten Material vor: sie treten aber dort gegenuber schwereren und andersartigen in den Hintergrund. Der schwerste hier beobachtete Grad der Röntgenschädigung liegt vor, wenn die Zelle bald nach der Bestrahlung abstirbt. Der Zellinhalt verlagert sich, wird blasser grün oder färbt sich bräunlich. Gelegentlich tritt auch ein hyaliner Tropfen von Fett oder Öl auf. Um die Zelle herum befindet sich ein feinkörniger Hof; die Zelle löst sich auf und hinterläßt ein paar Granula, ohne daß ein Zellhautrest zu sehen wäre. (Abb. 6b und c, S. 195 zeigen solche Zellreste bei abgestorbenen Zellen einer Kolonie.)

Ist die Lebensfähigkeit nicht sofort ganz zerstört, so kann die Zelle mehrere Tage hindurch äußerlich unverändert liegenbleiben und dann absterben, oder sie wächst zu einer manchmal tief grün gefarbten Riesenzelle heran. (Abb. 6d, abnorm große Viererzellen.) Diesem Wachstum folgt jedoch oft keine Teilung, sondern eine anscheinend fettige Degeneration oder ein feinkörniger Zerfall. Zuweilen kommt es noch zur Anlage einer mehr oder weniger median verlaufenden seichten Teilungsfurche, die aber nicht mehr zu vollständig getrennten Tochterzellen führt. In anderen leichteren Fällen entstehen noch 2 oder 3 (Abb. 6a), 4 oder 5 Zellen. Die Teilungsprodukte sind meist ungleich groß (Abb. 6d), verklumpt (Abb. 6b und c) und selten lebensfahig. Andererseits kann auch aus einer Riesenzelle sehr verspatet auf einmal ein großer Zellhaufen frei werden — in einem Falle waren es 56 Zellen — , zwischen denen sich auch bereits abgestorbene Zellen und Zellreste befinden können[1]. Sowohl bei der unvollständigen Trennung der Tochterzellen voneinander als auch bei dem gehemmten Platzen der Mutterzelle liegt wohl eine Änderung in der Beschaffenheit der Zellhaut oder des Plasmas der Mutterzelle vor. Ähnliches ist wohl auch der Fall, wenn bei der 8er- oder 16er-Teilung — meist verzögert gegenüber normalen Teilungen — nicht alle Zellen sofort normal frei werden. Die Nachzügler sind oft mit der Kapillare nicht voneinander zu trennen, so daß es den Anschein hat, als ob die Plasmateilung nicht vollständig durchgeführt sei, oder als ob die Zellhaut der Mutterzelle die Tochterzellen noch zu fest umschließe. Abb. 5a (S. 192) zeigt in der Mitte eine solche Hemmung leichter Art, Abb. 5b (ebenda) die entstandenen Kolonien (etwas größerer Bild-

[1] *Forssberg* (1934) beschreibt bei *Mesotaenium caldariorum* Riesenzellen mit bis zu acht Kernen; diese Zellen gehen ungeteilt zugrunde.

ausschnitt). Beim Heranwachsen kann die Trennung der Zellen voneinander vollständig werden.

Diese Schädigung ist aber wohl keine spezifische, primäre Röntgenstrahlenwirkung. Normalerweise geht die 8- und 16-Zellenbildung innerhalb der Mutterzelle vor sich; die reifen Teilprodukte werden, voneinander gesondert, durch Platzen der Zellhülle auf einmal frei, ohne daß man einzelne Teilungsstadien vorher beobachten könnte. Danach erscheint ein *Vorausgehen der Kernteilung* mit *nachfolgender Einteilung des Plasmas* je nach der Zahl der vorhandenen Kerne (= freie Zellbildung) nicht ausgeschlossen, wie schon oben erwähnt wurde. Die Befunde an geschädigten Zellen könnte man jedoch auch im Sinne einer



Abb. 6. Bestrahlt. a Dreierstadium. 308 mal. b Kolonien mit Resten abgestorbener Zellen und verklumpten Zellen. 308 mal (?). c Kolonie mit Resten abgestorbener Zellen und ungleich großen Zellen. 308 mal. d Links Riesenviererzellen ungleicher Größe, rechts junge normale Zellen, mit der Pipette für den Zweck des Größenvergleichs aufgebracht. 192 mal

gleichzeitigen Kern- und Plasmateilung deuten: Das geschädigte Material führt die Entstehung der Tochterzellen sozusagen schrittweise vor. Man findet als frei gewordene Zellen 2er (= 2 Hälften), 3er (= eine Hälfte schon weiter geteilt, oder — bei gleicher Größe — beide Hälften weiter geteilt, aber ein Viertel zugrunde gegangen), 5er (eine Hälfte in 4, die andere ungeteilt, oder in 2 geteilt, von denen eine zugrunde ging), 6er (eine Hälfte in 4, die andere in 2 oder in 4 minus 2 geteilt) usw. Ebenso viel Berechtigung hätte aber die Annahme, daß während der vorangehenden Kernteilung ein oder mehrere Tochterkerne nicht voll lebensfähig ausgestattet, und daß diese Kerne dann auch nicht in normaler Weise mit der zugehörigen Plasmaportion umgeben werden, so daß deshalb nicht einkernige normale Tochterzellen entstehen können.

Ob auch bei der Abänderung der Teilung von *Chlorella*, wie bei den meisten beobachteten Objekten als Röntgenschädigung eine primäre Kernschädigung (eventuell mit sekundärer oder auch gleichzeitiger Wirkung auf das Plasma) vorliegt, kann ja nur die eingehende cytologische Untersuchung aufklären.

Ist die Teilungsfähigkeit nicht so stark geschädigt, wie bei den eben geschilderten Riesenzellen, so tritt als nächst niederer Grad der Schädigung eine Herabsetzung der Lebensfähigkeit der entstandenen Zellen auf. Hier kann man zwei Stufen unterscheiden: Im schwereren Falle

sieht man bei der äußerlich normal erfolgten Teilung, daß z. B. von 16 Zellen 1, 2, 4 oder 8 kleiner sind als die übrigen (Abb. 4a und b, S. 192, Fall einer 15er-Kolonie von unbestrahltem, abweichendem Klon). Entsprechendes kommt auch bei 8er-Teilung vor. Es können auch ungerade Anzahlen von Zellen klein sein. Isoliert man diese kleinen Zellen, so wachsen sie — im Gegensatz zu kleinen Zellen aus unbestrahltem Material — nicht, sondern gehen zugrunde. Als ganz seltene Ausnahme kam es einmal noch zu einer Vierteilung.

Bei dem leichteren Grad verminderter Lebensfähigkeit entstehen anfangs normal aussehende, gleich große 8er- oder 16er-Zellen, die dann am ersten Tage auch irrtümlich als normale 8er- oder 16er-Teilung

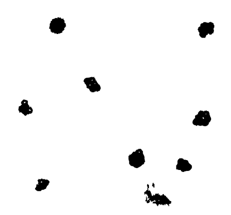


Abb. 7. Bestrahlt, 8er-Kolonie, isoliert und weiter geteilt. Obere Reihe: 2mal 7 Zellen; mittlere Reihe: 5, 6, 8 Zellen, untere Reihe 5, 8, 5 Zellen, in der linken 5er-Kolonie ist die 5. Zelle bereits in 8 weiter geteilt. Etwa 68mal.

gebucht werden, von denen sich aber eine oder mehrere Zellen bei der Nachkontrolle in den nächsten Tagen als nicht lebensfähig erweisen: Sie wachsen nicht mit den Geschwistern heran, und an Stelle der 8 Zellen findet man dann beispielsweise nur noch 7, 6 oder 5 Zellen (Abb. 7), während die anderen schon ganz aufgelöst sind oder sich im Prozeß der Auflösung befinden. Ebenso entstehen auch die Zellanzahlen zwischen 8 und 16 und zwischen 16 und 32 durch früheres oder spateres Ausfallen von Tochterzellen.

Es gibt auch noch eine andere Entstehungsart von abweichenden Zellanzahlen; dabei ist nicht die Lebensfahigkeit herabgesetzt, sondern die Teilung ist abgeändert. Es entstehen z. B. 12 Zellen, darunter 4 große, — oder 13, darunter 3 große —, oder 14, darunter 2 große. Zellreste sind nicht zu bemerken, und die entstandenen Zellen machen auch einen gesunden Eindruck. Die großen teilen sich zuweilen schneller weiter als die übrigen; bei der Bildung von 20 Zellen bleiben dagegen 4 gelegentlich in der Teilung zurück. Diese Abweichung steht der im unbestrahlten Material beobachteten nahe, wo aus der großen 15er-Zelle 2mal 16 = 32 oder 2mal 8 = 16 gebildet werden. In einem Stammbaumast im bestrahlten Material kam die 15er-Zellenbildung mit nachfolgender 32er-Teilung gehäuft vor, und zwar in der 9. Generation eines sonst völlig normalen Stammbaumzweiges (daher der Kurvenanstieg Abb. 10, S. 199). Hier gab es von einer 16er-Kolonie 7mal 15 neben 4mal 8 und 5mal 16. In der 10. Generation entstanden aus den großen

Zellen 6 mal 32 und 1 mal 16 = 2 mal 8. Es kommen auch Zahlen unter 32, z. B. 30 und 31, häufiger vor. Abb. 3c, S. 188, zeigt 28 Zellen. Wie im unbestrahlten Material ist die Bildung großer Zellen wohl auf eine ausgebliebene Teilung — vielleicht nur des Plasmas — während der Tochterzellbildung zurückzuführen. Ihre cytologische Untersuchung müßte darüber Aufschluß geben, ob Mehrkernigkeit oder Mehrwertigkeit eines einzigen Zellkernes vorliegt, ob Wesensverschiedenheiten bestehen zwischen den großen Zellen im unbestrahlten und denen im bestrahlten Material.

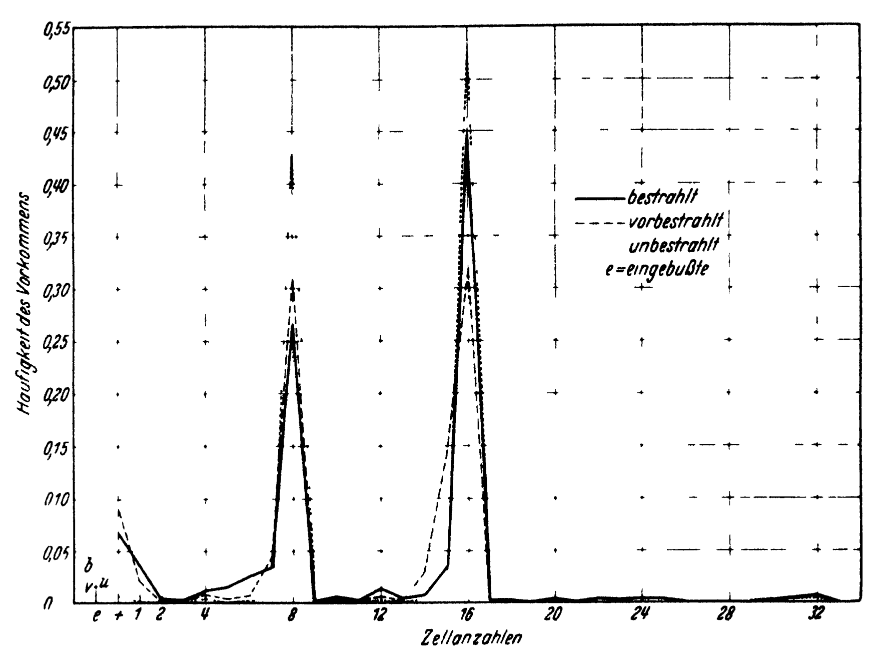


Abb. 8. Verteilungskurve der relativen Häufigkeit der einzelnen Zellanzahlen, die bei der Teilung entstehen. Ausgezogene Kurve = bestrahltes Material (Anzahl der Fälle = 6168). Gestrichelte Kurve = vorbestrahltes Material (Anzahl der Fälle = 1010). Punktierte Kurve = unbestrahltes Material (Anzahl der Fälle = 6100).

Eine verspätet einsetzende Teilung der Mutterzelle ist immer schon ein Anzeichen für eine Beeinflussung durch die Bestrahlung bei sonst scheinbar unverändert gebliebenen Generationen. Sie ist die leichteste Form der Schädigung. Zur verzögerten Teilung kommt häufig das Verklumpen von Zellen hinzu, was die genaue Zählung der entstandenen Zellen sehr erschwert.

Entsprechend den verschiedenen Entstehungsmöglichkeiten der abnormen Zellanzahlen kann jede Zahl von 2 bis 32 und sogar darüber hinaus verwirklicht werden. Die Abb. 8 und 9 gibt in der ausgezogenen Kurve die Häufigkeitsverteilung; die Gesamtanzahl der beobachteten

Teilungsfälle wurde gleich 1 gesetzt. Wie im unbestrahlten Material liegen die beiden Hauptgipfel bei 8 und 16. Sie sind rechtsseitig asymmetrisch, erreichen nur eine geringere Höhe als die Gipfel der Kurve für das unbestrahlte Material. Dafür nehmen die Anzahlen vor 8 und vor 16 zu. Im übrigen verläuft die Kurve immer oberhalb derjenigen für das unbestrahlte Material.

Es zeigt sich deutlich, daß als Zellanzahlen die Potenzzahlen von 2 bevorzugt entstehen, dann folgen in der Häufigkeit die Zahlen, die ein Vielfaches von 4 darstellen, dann die übrigbleibenden, durch 2 teilbaren

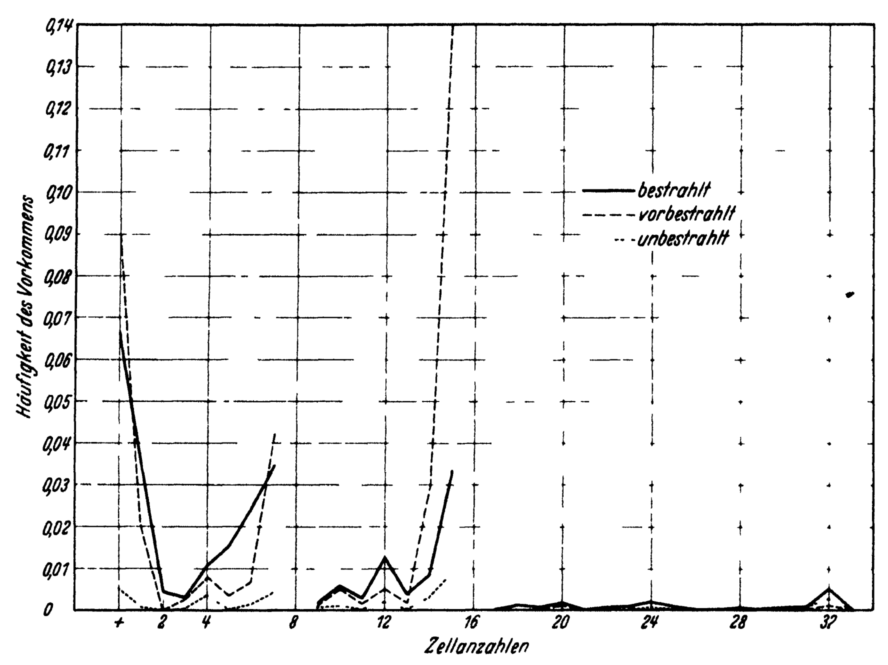


Abb. 9. Verteilungskurve der relativen Häufigkeit der einzelnen Zellanzahlen, die bei der Teilung entstehen. Ausgezogene Kurve = bestrahltes Material (Anzahl der Fälle = 6168). Gestrichelte Kurve = vorbestrahltes Material (Anzahl der Fälle = 1010). Punktierte Kurve = unbestrahltes Material (Anzahl der Fälle = 6100). Gegenüber Abb. 8 vergrößerter Maßstab.

Zahlen; die Minima treffen — außer bei 7, 5 und 15, wo die Kurve hoch verläuft —, auf ungerade Zahlen. Daß die Zahlen 21 und 27 im vorliegenden Material, auch im vorbestrahlten, nicht verwirklicht wurden, ist wohl Zufall. In Abb. 9 ist ein größerer Maßstab gewählt, um die immerhin kleinen Gipfel zu deutlicherer Darstellung zu bringen.

Im einzelnen sei hier noch das Ergebnis einer Serienbestrahlung mitgeteilt. Vormittags 9 Uhr wurden 6mal 16 Zellen (Geschwisterkolonien) auf je einen Agarhängetropfen vereinzelt aufgebracht. Präp. I wurde um 10 Uhr, Präp. II um 13 Uhr, Präp. III um 16 Uhr, Präp. IV

um 19 Uhr, Präp. V am nächsten Morgen um 9 Uhr mit 10000 r in $9^1/_4$ Minuten bestrahlt (vgl. oben). Präp. V zeigte bereits, als es von der Bestrahlung abgeholt war, 15mal 8 Zellen, die 16. war am Abend in 16 geteilt.

Präp. I hatte am nächsten Vormittag nach der Bestrahlung 4 Teilungsfälle aufzuweisen, Präp. II bis IV waren noch ungeteilt, aber herangewachsen. Es ist wahrscheinlich, daß im Präp. V die Bestrahlung die 15 Zellen schon fast oder ganz vollständig in 8 Tochterzellen geteilt betroffen hat, während die 16., als 16er-Teilung etwas langsamere Zelle,

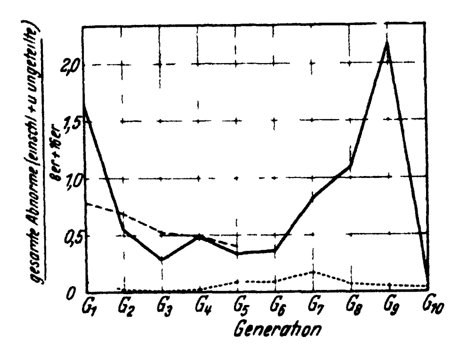


Abb. 10. Verschiebung des Verhaltnisses der gesamten abnormen Teilungsvorkommen zu den normalen (8er + 16er) in Abhangigkeit von der Generation (siehe Text). Ausgezogene Kurve = bestrahltes Material (Anzahl der Falle 6168) Gestrichelte Kurve vorbestrahltes Material (Anzahl der Falle 1010) Punktierte Kurve unbestrahltes Material (Anzahl der Falle = 6100).

auch schon in Teilung gewesen sein muß; deshalb wird im folgenden die zweite Generation nach der Isolierung der 16 Zellen als erste Generation nach der Bestrahlung betrachtet.

Das Ergebnis dieses Bestrahlungsversuchs mit Geschwisterzellen (16ern) ist folgendes·

Prap. I: 3 Zellen † (abgestorben). 5 ungeteilt, d. h die Hälfte der Zellen hat die schwerste Schadigung erlitten Von den übrigen 8 Zellen sind 5 abnorm, namlich: 1mal 3er, 1mal 9er, 1mal 14er, 1mal 15er, 1mal 20er. Zwei von den 3 anscheinend normalen Zellen im Prap. I haben 16 Zellen gebildet, die aber schon in der nachsten Generation abnorme Nachkommen haben. Die dritte Zelle ergab 8 Tochterzellen; in der 6. Generation trat eine 15er-Teilung auf: die Nachkommen dieser 15er-Kolonie waren neben normalen 8ern und 16ern 7mal 15er, 2mal 14er und 1mal 32er.

Im Prap. II ist eine Zelle abgestorben, 9 bleiben ungeteilt. Normale kommen nicht vor, die 6 abnormen sind 2mal 2er, 1mal 4er, 1mal 5er, 1mal 6er und 1mal 12er.

Im Präp. III sind, wie in Präp. I, 3 Zellen abgestorben, 5 ungeteilt geblieben; es fällt also wieder die Hälfte der Zellen aus. 4 Zellen gingen durch Unglücksfall verloren. 2 bildeten 16 Tochterzellen. (Die eine, normale, 16er-Gruppe ergibt in der Nachkommenschaft abnorme Teilungszahlen, z. B. 6, 12, 15 und mehrmals 32. Die andere 16er-

Gruppe, bei der 4 Zellen klein geblieben waren, gibt 4mal 16 und 4mal 8, in deren Nachkommenschaft keine Abnormität beobachtet wurde. Die 4 kleinen Zellen sterben ab, außerdem eine andere, 3 bleiben ungeteilt, so daß also im ganzen von dieser ungleichzelligen 16er-Gruppe 8 Zellen ausfallen, die übrigen 8 normale Nachkommen zu haben scheinen (bis zur 6. Generation verfolgt). Neben den beiden eben beschriebenen 16ern entstehen noch 2mal 4 Zellen, davon ist die eine Vierergruppe ungleichzellig; 3 Zellen sterben ab, die 4. ergibt in verspäteter Teilung 8 ungleich große Zellen, deren Nachkommen abnorm sind. Die zweite Vierergruppe bleibt ungeteilt.

Im Präp. IV sterben 9 Zellen ab, 2 bleiben ungeteilt. Im übrigen entstehen 3mal 8, 1mal 5 und 1mal 6. Die Nachkommen der drei 8er-Kolonien ergeben in der nächsten und übernächsten Generation absterbende Zellen und abnorme. Die erwähnten abnormen Geschwister dieser drei 8er haben ebenfalls abnorme Nachkommen, die sich zum Teil nicht mehr über die dritte Generation hinaus weiterziehen lassen.

Im Präp. V bestand die 1. Generation, wie oben erwähnt, aus 15mal 8 und 1mal 16 Zellen. Aus diesen Zellen entstanden folgende Nachkommen (die 8er-Kolonien haben den Zahlenindex 1 bis 15 erhalten).

8_1 = 4 + (abgestorben), 1mal 8, 3mal 16.
8_2 = 1 +, 1mal 4 (ungleich), 1mal 7 (klumpig), 5mal 16.
8_3 = 1 +, 1mal 4, 1mal 8 (ungleich), 5mal 16.
8_4 = 1mal 4 (später 6 ungleiche), 1mal 4 (später 19), 1mal 7 (?), 1mal 15 (?), 3mal 16, 1mal 19 (?). Die mit Fragezeichen versehenen waren schon zur Kolonie herangewachsen.
8_5 = 3 ungeteilt, 1mal 15 + R (kleiner Zellrest), 1mal 16 (?), 3mal 16.
8_6 = 7mal 16, 1mal 18 oder 19.
8_7 = 1 +, 2 ungeteilt, 2mal 8, 1mal 10, 2mal 16.
8_8 = 3 +, 1mal 12, 1mal 15, 3mal 16.
8_9 = 1 ungeteilt, 1mal 5, 1mal 10, 1mal 14, 4mal 16.
8_{10} = 1 +, 1 ungeteilt, 1mal 8 (später 6), 5mal 16.
8_{11} = 1 ungeteilt, 1mal 5 (klumpig), 1mal 15, 5mal 16.
8_{12} = 1 +, 2 ungeteilt, 1mal 13, 2mal 15, 2mal 16.
8_{13} = 1 +, 1 ungeteilt, 1mal 2, 4mal 16, 1mal 24.
8_{14} = 2 +, 1 ungeteilt, 2mal 7, 1mal 14, 2mal 16.
8_{15} = 3 +, 2 ungeteilt, 1mal 6, 2mal 16.
16 = 1 +, 2 ungeteilt, 1mal 2, 1mal 4, 1mal 8, 1mal 14, 1mal 15, 8mal 16.

Von insgesamt 134 Teilungsfällen der 16 Zellen aus Präp. V in der Generation nach der Bestrahlung sind zu buchen: 35 + (abgestorben) und ungeteilt, 30 bzw. 32 abnorm, 67 bzw. 69 normal.

Das Verhältnis von Abnormen : Normalen ist also 65 : 69, oder, wenn die beiden fraglichen 16er auch abnorme Teilungen sind, 67 : 67, d. h. die Hälfte ist abnorm.

Das Verhältnis Abnorm : Normal ist in Präp. I 13:3; in Präp. II 16:0; in Präp. III 11:1; in Präp. IV 13:3; in Präp. V 1:1.

Aus dem Ergebnis dieser Serienbestrahlung läßt sich noch nichts für die Möglichkeit erschließen, bestimmte Stadien der Tochterzellentwicklung mit der Bestrahlung zu treffen. Verhindert wird dies dadurch, daß die 8er- und die 16er-Teilung als solche nicht vorher erkennbar ist und regellos vorkommt. Serienbestrahlungen ließen sich erst dann planvoll ansetzen, wenn es gelänge, die Zelle durch äußere Einwirkungen zur Bildung einer bestimmten Anzahl Tochterzellen zu veranlassen.

Das vorbestrahlte Material.

Das vorbestrahlte Material stammt von Zellen ab, die mit 10000 r in 5 Minuten (0,124 Å) bestrahlt worden waren. In ihrer Nachkommenschaft überwogen Abweichungen in der 8er-Teilung. Anfangs waren im wesentlichen abweichende Tochterzellanzahlen isoliert worden. (Über die Abstammung vgl. S. 184.)

Bei der Neuisolierung liegen die Abweichungen ebenso sehr im Bereich der 16er- wie der 8er-Teilung, ein Zeichen dafür, daß die anfängliche Bevorzugung der 8er-Teilung keine beständige Eigenschaft dieses Klons ist.

Das vorbestrahlte Material hat einen etwas geringeren Prozentsatz von Teilungsabweichungen als das bestrahlte, nämlich 27,2% gegenüber 29,05% (unbestrahlte im Durchschnitt 5,28%). Abb. 10, S. 199, läßt erkennen, daß die Kurve für das Verhältnis Abnorme : 8ern + 16ern, generationsweise eingetragen, etwas höher verlauft als diejenige für die bestrahlten Klone. Daß in der 1. Generation nur etwa halb soviel Abnorme vorkommen wie in der 1. Generation nach der Bestrahlung, hat seine natürliche Ursache darin, daß in der ersten Generation der Bestrahlten die Wirkung der Bestrahlung maximal (in den Nichtüberlebenden) zum Ausdruck kommt, während ja bei den Neuisolierten die Schädigung der weitergezogenen überlebenden Zellen erfaßt wird.

Zeichnet man die Häufigkeitsverteilung für die Zellanzahlen, die bei der Tochterzellbildung entstanden sind (Abb. 8, S. 197, und 9, S. 198, gestrichelte Kurve), so ergibt sich, daß die Streuung geringer ist als beim bestrahlten Material. Die Kurve liegt daher bei 7, 8, 14 und 15 höher als beim bestrahlten Material. Bei 32 verläuft sie von allen drei Kurven am tiefsten. Die Gipfel fallen auf dieselben Zahlen wie die Gipfel der beiden übrigen Kurven.

Dafür, daß die Streuung geringer ist, während der Prozentsatz Abnormer praktisch der gleiche blieb, können zwei Ursachen in Betracht gezogen werden.

Erstens könnten sich in der Röhrchen-Massenkultur in den 2 Jahren nach der Bestrahlung die schwereren Teilungsabweichungen nicht

erhalten haben; die Schädigung könnte abgeklungen sein. Gegen diese Deutung spricht jedoch die Tatsache, daß die schweren Schädigungen auch bei der zweiten Neuisolierung im Dezember 1936, also nach weiteren 10 Monaten, noch vorhanden waren, wie die Abb. 6a bis d, S. 195, beweisen.

Zweitens besteht die Möglichkeit, daß bei der niedrigeren Anzahl der im vorbestrahlten Material beobachteten Teilungsfälle (1010 in 5 Generationen gegenüber 6168 in 10, bzw. 6100 in 20 Generationen) die stärkeren Abweichungen wegen ihres selteneren Vorkommens nicht so häufig zur Beobachtung gekommen sind. Bei der gewahlten Versuchsanordnung betragen die Abnormen bei den Bestrahlten 0,2905, die 8er + 16er 0,7095 (Gesamtanzahl = 1 gesetzt), bei den Vorbestrahlten 0,272, die 8er + 16er 0,728 und bei den unbestrahlten (einschließlich der abweichenden) 0,052, 8er + 16er 0,948, dieses Verhalten veranschaulichen ja auch die hohen Gipfel der Verteilungskurven bei 8 und 16 in Abb. 8, S. 197, und Abb. 9, S. 198 (in dieser in dem gewahlten Maßstab nicht einzuzeichnen).

Erwähnt sei noch, daß auch der Prozentsatz verklumpter Teilprodukte im vorbestrahlten Material in gleicher Höhe liegt: für die bestrahlten Klone liegt er bei 0,42, für die vorbestrahlten bei 0,49 und für die unbestrahlten bei 0,08 %.

Auch bei dem am meisten abweichenden unbestrahlten Klon hat sich in Röhrchenkultur die Neigung zu Teilungsstörungen, wie sie oben bei dem unbestrahlten Material beschrieben wurden (S. 191f), erhalten, was sich bei Neuisolierungen im Dezember 1936 herausstellte (vgl. Abb. 4 und 5). Vielleicht hat das Trockenwerden des Praparates, das zu diesen Abänderungen Veranlassung gab, ebenfalls eine erbliche Abänderung hervorgerufen. Bei höheren Pflanzen ist ja die erhohte Neigung trocken gewordener Samen zum Mutieren bekannt. Ob die Schädigung hier in diesem Klon von *Chlorella* ebenfalls, wie die Röntgenschädigung, in vollem Umfange erhalten blieb, wurde noch nicht naher untersucht.

Schlußbetrachtung.

Die Versuche haben ergeben, daß *Chlorella vulgaris* für vererbungsbiologische Untersuchungen geeignet ist. Die durch die Röntgenbestrahlung verursachte Abänderung im Teilungsablauf: die Teilungsverzögerung, die Hemmung oder der Ausfall einer Hälfte, eines Viertels, Achtels oder Sechzehntels der 8 oder 16 Teilungsprodukte, kann durch eine erbliche Kernschädigung verursacht sein. Um dieses zu beweisen, ist die eingehende cytologische Untersuchung erforderlich. Wie Stichproben erkennen lassen, wird die Durchführung nicht unmöglich sein; hierbei machen sich jedoch die eingangs erwähnten Schwierigkeiten bemerkbar, die in der geringen Größe des Objekts begründet sind. Es

muß nun versucht werden, mit denjenigen technischen, insbesondere optischen Methoden (Ultraviolett-Mikrophotographie nach *A. Köhler*, Jena)[1] an die Lösung der offen gebliebenen Fragen heranzugehen, die in der Cytogenetik der Tiere und Pflanzen (*Caspersson*, *Oehlkers*) mit Erfolg angewendet werden und bereits in der Virusforschung Eingang gefunden haben.

Daß wir es in der Mikrobiologie mit wesentlich kleineren Objekten zu tun haben als die übrige Biologie, scheint sich auch schon im Verhalten gegenüber der Röntgenbestrahlung zu zeigen.

Die hier an *Chlorella* verabreichte Dosis von 10000 r ist im Sinne therapeutischer Bestrahlungen menschlicher Gewebezellen eine hohe Dosis; sie entspricht vielleicht etwa der Halbwertsdosis für *Chlorella*, wie man aus den Absterbezahlen in der ersten Zellfolge in den einzelnen Versuchen [vgl. Serienversuch Präp. I, III, V (Kolonie 8_1)] und aus anderen hier nicht im einzelnen aufzuführenden Fällen abschätzen möchte.

In den Versuchen mit *Chlorella* waren selbst gleichalte Geschwisterzellen aus demselben Klon verschieden empfindlich. Erbliche Veranlagung und Außenfaktoren waren für sie praktisch gleich. Für die Erklärung der verschiedenen Strahlenempfindlichkeit bleiben zwei Möglichkeiten:

1. Der verschiedene Zustand der Kerne, die in verschiedenen Phasen der Teilung verschieden empfindlich sein konnten. Dies ließ sich nicht prüfen, da es bisher nicht möglich war, *bekannte* Stadien der Tochterzellbildung zur Bestrahlung zu bringen.

2. Die geringe Große des Zellkerns (bzw. des Objektes überhaupt), die im Sinne der Treffertheorie der Bestrahlung für die Absorption der Strahlungsquanten von ausschlaggebender Bedeutung ist (*R. Glocker* und *A. Reuss*).

Auf Grund dieser Treffertheorie und der Absterbeordnung bei bestrahlten Bakterien haben verschiedene Forscher (*Mohler* und *Taylor*) geschlossen, daß ein Zellteil bestimmter Größe durch die Bahn des Elektrons und die entstehenden Ionen getroffen werden muß, wenn die Wirkung der Bestrahlung für die Bakterien tötlich sein soll. Sie sprechen von einer empfindlichen Zone, die für Kathoden- und Rontgenstrahlen gleich sei. Der numerische Wert des Durchmessers der empfindlichen Zone stelle, unabhängig von der Deutung, eine gute Charakterisierung der bakteriziden Wirkung der Rontgenstrahlen dar.

Allgemein gilt der Kern als der strahlenempfindliche Teil der Zelle (*Juul* und *Kemp*, *Schinz*). Nach dem Ausfall der *Feulgen*schen Nuclealreaktion bei Bakterien ist die Kernsubstanz in der Zelle diffus verteilt[2].

[1] Vgl. Anmerkung S. 185. — [2] Vgl. indessen die soeben erschienene Arbeit von *Stille*.

während bei den *Cyanophyceen* sich eine Herausdifferenzierung der Kernsubstanz in einem bestimmten Zellbezirk anzubahnen scheint. Bei Organismen mit Zellkernen finden wir dann auch einen komplizierten Teilungsmechanismus mit Hilfsstrukturen, die die gleichmäßige Verteilung der Erbsubstanz auf die Tochterzellen in hohem Grade gewährleisten. Innerhalb der Gruppe der Mikroorganismen finden wir Verhältnisse, die vielleicht eine phylogenetische Entwicklungsreihe des Kerns widerspiegeln. Nun ist die Bakterienzelle selbst mit dem als diffus verteilt anzusehenden Kernmaterial durchschnittlich kleiner als das kleinste Chromosom.

Bei *Bacillus mycoides* ließ sich selbst bei 14 Stunden langer Bestrahlung nur eine Wirkung in der obersten Schicht der exponierten Kolonie nachweisen; jedoch müssen, wegen der Wirkung des Zeitfaktors bei schnellwüchsigen Zellen, diese Versuche mit einer Apparatur wiederholt werden, welche die Verabfolgung einer *hohen* Dosis in *kurzer* Zeit gestattet.

Ein Organismus von noch geringeren Größenausmaßen, nämlich *Vogelpestvirus* (*Levin* und *Lominski*), wurde erst bei Bestrahlung mit 1,5 bis 2 Millionen r soweit geschwächt, daß es für Immunisierungsversuche verwendet werden konnte. Leider geben die Verff. nicht die Bestrahlungsdauer an.

Wenn auch die Zahlen nicht absolut miteinander vergleichbar sein dürften wegen etwaiger qualitativer Verschiedenheiten der verwendeten Strahlung, so könnte doch im Hinblick auf die Treffertheorie ein Zusammenhang zwischen der Größe des Objekts bzw. seines strahlenempfindlichen Bezirks und der erforderlichen Trefferanzahl vermutet werden.

Zusammenfassung.

Mit Hilfe des Mikromanipulators läßt sich *Chlorella vulgaris* gut isolieren und auf 0,25 %igem *Liebig*-Agar im Hängetropfen züchten. Sie teilt sich unter diesen Bedingungen normalerweise in 8 oder 16 Zellen. Gelegentlich kommen auch 7 oder 15 Zellen vor, unter denen eine größer ist und bei der nächsten Teilung in der Regel 32 oder 16 (= 2 mal 8) Zellen ergibt.

Durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (10000 r in 5 Minuten bzw. in $9^1/_4$ Minuten) wird eine Schädigung des normalen Teilungsablaufs verursacht, die an Einzellkulturen durch Generationen hindurch weiter verfolgt wurde. Diese Schädigung ist in verschiedenem Grade ausgeprägt und auch unter Geschwisterzellen individuell verschieden.

1. Grad: Abtötung und vollständige Teilungs- und Wachstumshemmung.

2. Grad: Teilungsfähigkeit ganz oder teilweise aufgehoben, Wachstumsfähigkeit erhalten; führt zu Riesenzellbildung und unternormalen Zellenzahlen.

3. Grad: Abnorme Teilungszahlen: a) Die 3 bzw. 4 Teilungsschritte, die zu 8 bzw. 16 Tochterzellen führen, werden nicht alle durchgeführt. Ob die Kernteilung der Plasmateilung vorangeht, oder ob jeder Kernteilung eine Plasmateilung unmittelbar folgt, war nicht zu entscheiden; jedoch hat die Annahme einer vorangehenden Kernteilung die größere Wahrscheinlichkeit für sich. b) Es erfolgen zwar alle Teilungsschritte, aber früher oder später erweisen sich Teilungsprodukte als nicht voll lebensfähig und sterben ab.

Außerdem kommen auch Verschiebungen der Teilungsschritte vor, und zwar hinken Teile der Mutterzelle um einen Teilungsschritt nach, oder sie eilen um einen Teilungsschritt voraus. Im ersten Falle werden nachholend meist 32 Zellen, im zweiten meist nur 4 Zellen als nächste Tochtergeneration gebildet. Noch eine dritte Art der Verschiebung scheint vorzukommen: Wenn z. B. unter Geschwisterzellen die eine 12, eine andere dagegen 20 Tochterzellen bildet, so könnte bei der Aufteilung der gemeinsamen Mutterzelle die eine Tochterzelle das zu wenig mitbekommen haben, was die andere zuviel erhielt.

In den übrigen Fällen trägt die Schädigung typisch den Charakter der Röntgenschädigung, z. B. in der Bildung von Riesenzellen, in der verminderten und verzögerten Teilung, im körnigen Zerfall, zum Teil unter fettiger Degeneration, beim Absterben von Zellen.

In den beiden Klonen des unbestrahlten Materials, die mehr Abweichungen aufweisen als die übrigen Kontrollklone, haben diese Abweichungen, äußerlich gesehen, Ähnlichkeit mit Schädigungen, wie sie auch im bestrahlten Material vorkommen. Ob hier tatsächlich durch den Einfluß des Trockenwerdens eines Präparates eine ähnliche Art der Schädigung wie bei der Bestrahlung vorliegt, oder ob lediglich eine äußerliche Konvergenz besteht, kann nur die cytologische Untersuchung zeigen. Ebenso steht die Untersuchung darüber noch aus, ob diese Abänderung im unbestrahlten Material sich ohne abzuklingen erhalten hat; bei Neuisolierung des Klons nach über 2 Jahren war sie noch vorhanden.

Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Zellanzahlen zwischen 1 und 32 und darüber hat unter den gewählten Bedingungen ihre Hauptgipfel bei 8 und 16, sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten und vorbestrahlten Material. Diese Gipfel sind rechtsseitig asymmetrisch. Dies hat seine Ursache in der Entstehungsart der abweichenden Zellanzahlen.

Bevorzugt verwirklicht werden die Potenzzahlen von 2, dann folgen die Zahlen, die durch 4, darauf die übrigen, welche durch 2 teilbar sind, während die Minima auf ungerade Zahlen fallen, außer bei 7 und 15.

Der Einfluß der Bestrahlung auf das Teilungsgeschehen tritt zwar nicht immer in jeder Generation der Nachkommen einer geschädigten

Zelle in Erscheinung, aber die Nachkommen einer anscheinend normalen 8er- oder 16er-Zelle zeigen wieder die gleiche Teilungsstörung. Selbst nach zweijähriger Zucht des bestrahlten Materials in Röhrchenmassenkultur und auch noch $^3/_4$ Jahr später ließ sich bei Wiederisolierungen daraus (= „vorbestrahltes“ Material) und ihrer Weiterzucht nachweisen, daß der Einfluß der Bestrahlung erhalten geblieben ist. Der Prozentsatz Abnormer (27,2 %) liegt in derselben Höhe wie bei den Bestrahlten (29,05 %) (Kontrollklone insgesamt 5,28 %, ohne die stark abweichenden 1,55 %). Die Streuung ist im vorbestrahlten Material geringer als im bestrahlten.

Das Erhaltenbleiben der Schädigung spricht für das Vorliegen einer erblichen Schädigung mit wechselnder Penetranz. Läge nur eine Plasmaschädigung (Giftwirkung durch Ionisation bei der Bestrahlung) vor, so wäre wohl mit einem Abklingen der Schädigung mit zunehmender Anzahl der Generationen, besonders in der Massenkultur, im Laufe von über 2 Jahren zu rechnen gewesen.

Literatur.

M. W. Beijerinck, Bot. Ztg. 48, 726, 742, 758, 781, 1890. — *T. Caspersson*, Naturwiss. 24, 108, 1936. — *Derselbe*, Skand. Arch. Physiol. 78, Suppl. 8, 1936. — *Derselbe*, Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. 53, 403, 1937. — *K. Erdmann*, Pflügers Arch. 235, 470, 1935. — *A. Forssberg*, Acta radiol. (Stockholm) 14, 399, 1933. — *Derselbe*, ebenda 15, 603, 1934. — *R. Glocker* u. *A. Reuss*, Strahlentherapie 46, 137, 1933. — *R. Glocker*, *H. Langendorff* u. *A. Reuss*, ebenda 46, 517, 1933. — *R. Glocker*, ebenda 48, 1, 1933. — *J. Grintzesco*, Rev. génér. de Botanique 5, 1 u. 67, 1903. — *M. Hartmann*, Naturwiss. 25, 203, 1937; aus den Sitzungsber. Preuß. Akadem. Wiss. 1936. — *J. Juul* u. *T. Kemp*, Strahlentherapie 48, 457, 1933. — *A. Kuhn*, Naturwiss. 24, 1, 1936. — *E. Kuster*, Zelle und Zellteilung (botanisch), Handwtb. Naturwiss. X, 2. Aufl., 1935. — *H.* u. *M. Langendorff*, Strahlentherapie 46, 289, 1933. — *H.* u. *M. Langendorff* u. *A. Reuss*, ebenda 46, 655, 1933. — *B. S. Levin* u. *I. Lominski*, C. r. Acad. Sc. 203, 350, 1936. — *F. L. Mohler* u. *L. S. Taylor*, Amer. J. Roentgenol. 34, 89, 1935; Ref. in Zentralbl. ges. Radiol. 21, 249, 1936. — *F. Oehlkers*, Naturwiss. 25, 145, 1937. — *W. H. Pearsall* u. *L. Loose*, Proc. Roy. Soc. London (B) 121, 451, 1937. — *H. R. Schinz*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 51 u. 52; Ref. in Strahlentherapie 19, 911—916, 1925. — *H. Schreiber*, Strahlentherapie 49, 541, 1934. — *B. Stille*, diese Zeit chr. 8, 125, 1937.

(Aus dem Institut für Seefischerei Wesermünde und dem Botanisch-Mikrobiologischen Institut der Techn. Hochschule, Karlsruhe.)

Mikrobiologische Untersuchungen an Seefischen.

Von

Fr. Lücke und W. Schwartz.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. März 1937.)

Es ist allgemein bekannt, daß frische See- und Süßwasserfische zu den am leichtesten verderbenden Lebensmitteln gehören und in erheblich höherem Maße gefährdet sind als das Fleisch unserer Schlachttiere. Da Haltbarkeit und Frischezustand der Seefische heute, besonders bei größerem Abstand des Verbrauchsortes von der Küste, noch keineswegs befriedigen, erscheint es mit Rücksicht auf die hohen Verluste durch Verderb dringend erwünscht, die Infektionsverhältnisse aufzuklären und damit die Grundlagen für eine sorgfältigere Behandlungsweise der Fische zu schaffen.

Angeregt wurde unsere gemeinsame Arbeit durch Feststellungen, die *W. Schwartz* 1932 und 1933 in Karlsruhe an Seefischen gemacht hat, die in der üblichen Verpackung (Weidenkörbe mit Eis) verschickt worden waren. Aus diesen Versuchen ergab sich die Notwendigkeit, die Infektion der Fischoberflachen mit Bakterien und den Anstieg der Keimzahlen vom Fangplatz an über die verschiedenen Abschnitte zu verfolgen, die der Fisch auf dem Weg vom Fangplatz bis zum Verbraucher im Binnenland durchläuft. In Wesermünde und auf Helgoland wurden die Keimgehalte lebender Fische untersucht, auf zwei Fischdampferreisen in die Nordsee und zur Bäreninsel die Vorgänge beim Fang und während des Transportes im Fischdampfer, in Wesermünde in zahlreichen Versuchsreihen die Veränderungen der Keimgehalte vom Löschen des Fischdampfers bis zum ortsansässigen Einzelhändler. Aus dem Binnenland lagen bereits die Zahlen von *W. Schwartz* (1934) vor.

Es kam bei diesen Versuchen in erster Linie auf die *zahlenmäßige* Erfassung der Infektionsvorgänge an. Eine systematische Bearbeitung der isolierten Bakterienstämme soll in anderem Zusammenhang erfolgen.

Über die auf Seefischen vorkommenden Bakterien liegt schon eine Reihe von Arbeiten aus verschiedenen Ländern vor, z. B. aus Deutschland [*Schönberg* und *Debelic* (1933)], England [*Stewart* (1931, 1932), *Shewan* (1935)], Kanada [*Reed* und *Spence* (1923), *Gibbons* (1934)].

Alle diese Arbeiten haben aber eine andere Zielsetzung und verfolgen nicht den Keimgehalt vom Fangplatz bis zum Verbraucher.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verein Deutscher Ingenieure sowie dem RKTL danken wir für die großzügige Unterstützung

unserer Arbeit, desgleichen den Reedereien „*Nordstern*“, *Hochseefischerei, Wesermünde*, und „*Nordsee*“, *Deutsche Hochseefischerei A. G., Bremen-Cuxhaven*, und der *Seefisch-Markt A.-G. Wesermünde-Fischereihafen*. Unsere technische Assistentin, Frl. *E. Dreher*, Karlsruhe, hat uns bei der Vorbereitung der Fischdampferreisen und bei der Auswertung des Zahlenmaterials wertvolle Dienste geleistet.

Methode.

Die Infektion der Seefische geht von den Oberflächen aus, von der Körperaußenhaut und von der feinen, grauschwarzen Haut, welche die Bauchhöhle gegen das Fleisch abgrenzt. Die Tiefeninfektion des Fischfleisches ist ein sekundärer Vorgang, dessen Untersuchung Frl. *T. Woernle* unter unserer Leitung in Karlsruhe übernommen hat.

Der Keimgehalt der Oberfläche laßt sich in folgender Weise ermitteln. Mit Hilfe eines Zylinders aus dünnem Stahlblech, dessen eines Ende mit einer Schneide versehen ist, werden kreisformige Stücke der Haut ausgestanzt und mit sterilen Instrumenten von der Muskulatur abgelöst. Wir haben bei den ersten Versuchen Stücke von 1 qcm, später nur noch solche von 5 qcm verwandt, die stets von bestimmten Stellen der Außenhaut oder Bauchhaut entnommen wurden. Das Stanzen läßt sich entweder am ganzen Fisch ausführen oder an größeren Hautstücken, die mit steriler Pinzette und sterilem Skalpell abpräpariert und mit der Außenseite nach oben auf ein vorher mit Alkohol gereinigtes und abgeflammtes glattes Brett, das als Unterlage dient, aufgelegt werden. Die Verarbeitung erfolgte nach dem *Koch*schen Plattenverfahren in ähnlicher Weise wie bei entsprechenden Untersuchungen an Fleisch [*W. Schwartz* und *W. Bender* (1936)]. Die ausgestanzten Hautstücke gelangten in eine Schüttelflasche mit einer abgemessenen Menge von sterilem Wasser. Hier werden durch 10 Minuten anhaltendes Schütteln die Keime von der Haut abgelöst und im Wasser suspendiert. Je nach der Höhe der zu erwartenden Keimgehalte sind eine oder zwei Verdünnungen erforderlich. Aus der letzten Verdünnung werden $^1/_{10}$ bis 1 ccm in die *Petri*-Schale übertragen. Kleinere Fische[1] wurden gelegentlich auch im ganzen untersucht. Die Größe der Oberfläche laßt sich aus der Formel $S = K \cdot W^{\frac{2}{3}}$ berechnen, wobei S die Oberfläche in qcm, W das Gewicht in g und K einen Faktor bedeutet, den *Benedict* (1934) zu $K = 10$ angibt.

Da angenommen werden mußte, daß die Bakterienflora der Seefische auf marine Bakterienstämme zurückgeht und auf solche, die erst bei den Infektionsvorgangen im Lagerraum des Fischdampfers und auf dem Festland hinzukommen, haben wir in den meisten Versuchsreihen zwei Nahrböden nebeneinander benutzt, nämlich Fleischbouillongelatine, in der üblichen Weise aus magerem Rindfleisch mit Zusatz von 1 % Pepton, 0,5 % Kochsalz und 14 % Gelatine hergestellt, und Fischsalzgelatine, die man in folgender Weise bereitet: 1 Pfund Fisch (Kabeljau oder Schellfisch, Mittelstück) wird $^1/_2$ Stunde mit Leitungswasser gekocht, so daß sich nach dem Dekantieren etwa 500 ccm Fischwasser ergeben. Das Fischwasser erhält einen Zusatz von 3 % Kochsalz und wird zum Gelatinenährboden verarbeitet. Die entsprechenden Agarnährböden benutzten wir im allgemeinen nur zur Aufbewahrung von Stammkulturen[2]. Die Unterschiede bei Verwendung beider

[1] Einige Wittlinge aus der Wesermündung. — [2] Im Text und in den Tabellen werden die Nährböden mit folgenden ohne weiteres verständlichen Abkürzungen bezeichnet: FBG, FiSG, FBAg, FiSAg.

Gelatine-Nährböden nebeneinander waren zum Teil recht erheblich, jedoch ließ sich bis jetzt kaum irgendeine Gesetzmäßigkeit ableiten.

Für die Durchführung mikrobiologischer Untersuchungen auf dem Fischdampfer waren besondere Vorbereitungen und Einrichtungen erforderlich. Die Nährböden wurden in 200 Reagensgläsern gebrauchsfertig mitgenommen, ebenso etwa 150 Stück sterile *Petri*-Schalen zu je zwei in Papier verpackt und die erforderliche Anzahl von Pipetten in Blechhülsen. Zum Abschwemmen der Keime dienten Milchflaschen aus Jenaer Glas mit Gummistopfen und kurzen Glasstäben. Das Wasser (Leitungswasser für FBg, FBAg und Seewasser für FiSG, FiSAg) ließ sich in der Kombüse des Fischdampfers sterilisieren. Die Probenahme erfolgte an Deck in dem zur Trangewinnung vorgesehenen Raum unterhalb des Kartenzimmers der Kommandobrücke, die Verarbeitung der Proben in einer Kabine. Zur Aufstellung der frisch gegossenen *Petri*-Schalen dienten zwei mit Rand versehene Messingblechplatten in kardanischer Aufhängung, mit deren Hilfe es gelang, die starken Schiffsbewegungen wenigstens einigermaßen auszugleichen.

Die *Petri*-Schalen mit den erstarrten Nährböden standen in einem Drahtgestell innerhalb eines Blechmantels, der auf einer Bank aufgeschraubt war[1]. Zum Abflammen der Rohrchen und Ausglühen des Platindrahtes beim Isolieren einzelner Kolonien diente ein Spiritusbrenner.

Ergebnisse.

Allgemein hat sich gezeigt, daß die Keimgehalte großen Schwankungen unterworfen sind, selbst wenn man verschiedene Stellen desselben Fisches miteinander vergleicht. Die Schwankungen nehmen mit zunehmendem Alter des Fisches, vom Fangtag an gerechnet, zu. Sie sind besonders groß nach dem Transport im Fischdampfer, da sich während der Reise die Schleimmassen auf der Oberfläche durch den gegenseitigen Druck der Fischmassen verschieben; so kommt es, daß an manchen Stellen der Außenhaut die Keime in größten Mengen gehäuft liegen, wahrend an anderen Stellen die Keimgehalte abnorm niedrig sind. Allein schon aus diesem Grunde wäre die bakteriologische Methode als Marktkontrolle nicht geeignet. Man darf also nicht erwarten, daß sich, wie bei Laboratoriumsversuchen, die unter genau festgelegten Bedingungen durchgeführt werden, ein kurvenmäßig faßbarer Anstieg der Keimzahlen ergibt, sondern man ist auf eine möglichst große Zahl von Einzelbestimmungen angewiesen, die in geeigneter Form zur Darstellung gebracht werden müssen (vgl. Abb. 6, S. 227).

Inzwischen hat sich in Versuchen, die *Th. Zeiser* in Karlsruhe an Kabeljau, Heringen und Süßwasserfischen ausgeführt hat, gezeigt, daß bei storungsfreier Entwicklung der Bakterien die Keimgehalte sehr gleichmäßig über die Oberfläche des ganzen Fisches verteilt sind. In solchen Versuchen lassen sich also ohne weiteres Unterlagen für die Erkenntnis der Abhängigkeit der Lagerfähigkeit von der Temperatur und von anderen Faktoren ermitteln.

[1] Bei der Herstellung der Geräte hat uns Herr Prof. *Walger* in Karlsruhe beraten.

Der Keimgehalt des Wassers am Fangplatz und der Oberflachenkeimgehalt lebender Fische.

a) Der Keimgehalt des Seewassers nimmt von der Küste gegen die offene See und von der Oberfläche (nach einer vorübergehenden Steigerung) zur Tiefe ab. Da im allgemeinen in größerer Entfernung von der Küste und in den Tiefen von 100 bis 300 m gefischt wird, darf man erwarten, daß der Keimgehalt des Wassers an den Fangplätzen so niedrig ist, daß er praktisch vernachlässigt werden kann. Eine Bestimmung an den Heringsfangplätzen auf dem Fladengrund (Nordsee) ergab in etwa 150 m Tiefe im ccm im Durchschnitt 47 lebende Bakterien; dabei muß noch berücksichtigt werden, daß eine aseptische Wasserentnahme mit dem automatischen Wasserschöpfer schwierig durchzuführen ist. Es erscheint daher nicht ausgeschlossen, daß mindestens ein Teil der im Tiefenwasser nachgewiesenen Keime in Wirklichkeit erst nachträglich in die Wasserprobe hineingelangt ist. Dagegen enthielt Wasser aus dem Eingewöhnungsbecken des Helgoländer Aquariums nach zwei Bestimmungen auf FiSAg bis 5500 Keime je ccm und Wasser von der Helgoländer Reede[1] etwa 1300 Keime je ccm.

Eine andere Frage ist die, ob nicht auch an den Fangplätzen in nächster Nähe des Meeresbodens, besonders an den Stellen, wo er mit Algen oder Schwämmen besiedelt ist, höhere Keimgehalte auftreten, und ob nicht etwa während des Schleppens aus den aufgewühlten Bodenmassen größere Mengen lebender Bakterien in das Wasser gelangen[2]. In der Nähe der Bäreninsel und an den Fangplätzen im Weißen Meer sind ausgedehnte Schwammgründe vorhanden. Hier kommen häufig auch große Mengen von Schwämmen in das Netz. Untersucht man das Wasser aus den Hohlräumen eines solchen Schwammes, so ergeben sich z. B. Keimgehalte von 71615 (grauer Schwamm) und 6910 (gelber Schwamm) lebender Bakterien im ccm. Die Schwämme besitzen einen sehr unangenehmen, an manche Phosphorwasserstoffe erinnernden Geruch[3]. Die Fischdampfer-Kapitäne sind der Ansicht, daß sich Fisch von den Schwammgründen besonders schlecht hält und häufig auch geschmackliche Mängel aufweist. Bei Untersuchungen über die Eigenart der einzelnen Fangplätze muß auf diese Beobachtung zurückgegriffen werden.

b) Beim lebenden Fisch sind die Keimgehalte der Körperoberfläche gering. Wir vermuten, daß allein durch die ständige Erneuerung der

[1] Nach einer Bestimmung von Dr. *Schach*-Helgoland vom 7. November 1936. — [2] Über das Vorkommen von Bakterien in den obersten Schichten mariner Sedimente vgl. z. B. *Waksman* (1933) und *Zobell* (1936). — [3] Eine Bestimmung der Schwammproben war noch nicht möglich. Der an Phosphorwasserstoff erinnernde Geruch konnte auf eine biologische Phosphatreduktion am Meeresboden hindeuten.

Epidermis und des Schleimes, der die gesunde Fischhaut überzieht, eine Ansiedlung von Bakterien verhindert wird, ohne daß dazu eine besondere bakterizide Einwirkung des Schleimes erforderlich ist.

Zur Untersuchung der Oberflächenkeimgehalte lebender Fische sind die auf dem Fischdampfer mit dem Schleppnetz gefangenen Fische aus Gründen, die wir später besprechen werden, nicht verwendbar, selbst dann nicht, wenn sie lebend und ungeschädigt an die Oberfläche gelangen.

Da leider auf dem Fischdampfer zum Angeln keine Möglichkeit bestand, wurden von den Krabbenfischern lebend gefangene Wittlinge (*Gadus merlangus L.*) aus der Wesermündung untersucht, ferner kleine Kabeljau aus dem Helgoländer Aquarium und aus den Fischkästen auf der Helgoländer Reede und schließlich Kabeljau, die vor Helgoland mit der Angel, sowie Wittlinge, die auf dem Stationsdampfer mit Hilfe des kleinen Schleppnetzes in der 50-m-Rinne vor der Süd-West-Küste gefangen worden waren. Die Helgoländer Fische wurden sofort nach dem Fang durch Nackenschnitt getötet, wobei peinlich vermieden werden mußte, die eine Körperseite, die für die Probenahme bestimmt war, mit den Fingern zu berühren. Die ausgestanzten 5-qcm-Hautstücke konnten entweder sofort oder eine bis zwei Stunden später in der Biologischen Anstalt (Helgoland) verarbeitet werden[1]. Die Wittlinge aus der Wesermündung wurden in einem Eimer mit Seewasser lebend in das Institut für Seefischerei transportiert und dort etwa 5 Stunden nach dem Fang verarbeitet.

Die Keimgehalte lagen bei beiden Fischarten bei Verwendung von FSAg und FiSG meist zwischen 1000 und 7000 Keimen je qcm. FBG ergab ausnahmslos erheblich niedrigere Werte. In einem Falle (Kabeljau aus den Fischkästen) waren die FiSG-Werte um eine Zehnerpotenz höher als sonst. Es gelang nicht aufzuklären, ob es sich dabei um einen Versuchsfehler gehandelt hat.

Der Keimgehalt der an Bord des Fischdampfers mit dem Schleppnetz gefangenen Fische.

Zum Verständnis der Zusammenhänge ist es erforderlich, kurz auf die Vorgänge einzugehen, die sich beim Fang mit dem Schleppnetz abspielen (Abb. 1).

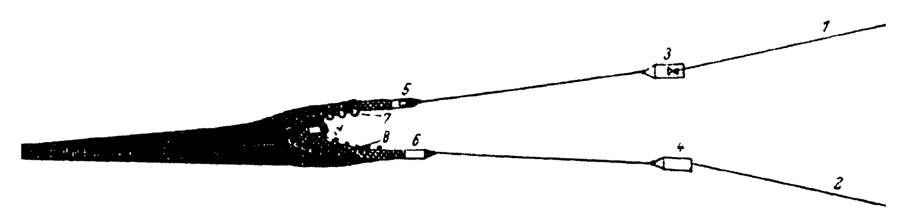


Abb. 1. Montierung des auf dem Fischdampfer benutzten Schleppnetzes.
1 u. 2: Kurrleinen zum Schiff. 3 u. 4: Große Scheerbretter mit Zwischenstandern.
5. u. 6. Kleine Scheerbretter. 7. Grundtau mit Rollen. 8: Kopftau mit Schwimmern.
9. Oberes Scheerbrett.

[1] Bei den Arbeiten auf Helgoland hatte ich mich der Unterstützung durch den Direktor der Biologischen Anstalt, Prof. Dr. *Hagmeier*, und besonders durch seinen Mitarbeiter, Dr. *Schach*, zu erfreuen. (*W. Schwartz.*)

Das trichterförmig gebaute Schleppnetz hat eine Länge von etwa 35 m, seine vordere Öffnung wird begrenzt oben durch das Kopftau von etwa 36 m Länge, unten durch das Grundtau von etwa 44 m Länge. Das Netzende (Steert) ist durch die Codleine verschlossen. Während des Schleppens wird das Netz durch zwei große und zwei kleine Scheerbretter oder an deren Stelle durch Knüppel und durch einen Kranz von luftgefüllten Glas- oder Metallkugeln und ein weiteres Scheerbrett an der oberen Netzkante offen gehalten. Die untere Netzkante, die dem Boden aufliegt, ist durch Holzrollen vor Beschädigung durch Unebenheiten des Bodens geschützt. Sind die Bodenverhältnisse am Fangplatz besonders ungünstig, so wird die ganze untere Netzfläche durch untergelegte Ochsenhäute vor dem Zerreißen gesichert. Geschleppt wird je nach der Ergiebigkeit des Fischgrundes 1 bis 4 Stunden, beim Heringsfang, der in der gleichen Weise, nur mit kleineren Netzen, erfolgt, meist 4 Stunden. Während des Schleppens fährt der Dampfer mit einer Geschwindigkeit von etwa 3 bis 6 Knoten. Das Netz wird durch zwei Stahltrossen (Kurrleinen) gehalten, die zur Netzwinde laufen. Das Einziehen (Hieven) wird dadurch eingeleitet, daß der Dampfer abstoppt, beidreht und das Netz längsseits heranholt. Dabei steigt der gefüllte Netzbeutel hoch und schwimmt bei größerem Fang an der Oberfläche. Er wird durch die Pokleine gegen völligen Verlust beim Zerreißen gesichert, mit Hilfe der Dampfwinde gehievt (Abb. 2) und durch Öffnen des Knotens am Steert über dem Vorderdeck entleert (Abb. 3), auf dem durch Schottenbretter einzelne Fächer abgeteilt sind. Der Druck, der besonders auf die im hinteren Netzabschnitt befindlichen Fische während des Schleppens und Überhievens ausgeübt wird, ist oft recht erheblich.

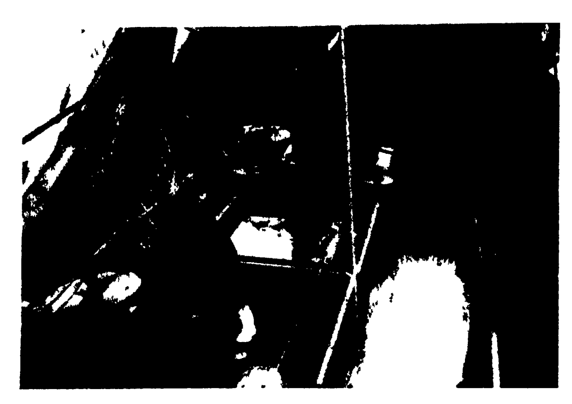


Abb 2*. Der Netzbeutel unmittelbar nach dem Hieven. Der Steuermann ist im Begriff den Netzbeutel zu öffnen Hinter dem Steuermann eine (noch geschlossene) Luke zum Fischraum.



Abb 3. Der Netzbeutel ist entleert. Die Fische liegen im Fach, in dem sie geschlachtet werden.

* Die Abb. 2 bis 5 wurden nach Leica-Aufnahmen während der Fischdampferreise zur Bäreninsel (1934) hergestellt (*W. Schwartz*).

Untersucht man den Oberflächenkeimgehalt von Fischen, die unmittelbar nach der Entleerung des Netzes auf Deck gelangt und zum Teil zwar geschädigt, aber doch noch am Leben sind, so ergibt sich, verglichen mit dem Keimgehalt der mit der Angel oder mit kleineren Netzen – also unter schonender Behandlung – gefangenen Fische, an fast allen Proben eine erhebliche Zunahme der Keime (Tabelle I). Es spielt sich also während des Fangens eine starke Infektion ab. Ihr Zustandekommen erklaren wir uns in folgender Weise: Die Fische werden durch den Druck beim Schleppen des Netzes im Steert, weiterhin während des Netzeinholens durch den Druckunterschied bei dem Übergang aus der Tiefe zur Meeresoberflache und endlich durch den gegenseitigen Druck beim Hieven des Netzbeutels geschädigt. Ein Teil des Darminhaltes tritt aus, einzelne Fische werden zerrissen, bei manchen wird die Schwimmblase zum Maul herausgedrangt. Dabei werden offenbar die Fischkorper durch den heraustretenden und im Wasser verteilten Darminhalt verunreinigt.

Tabelle I.

Keimgehalt der mit dem Schleppnetz gefangenen Fische.
B – Bareninsel, N – Nordsee.

Keime je qcm Korperoberfläche		
Kabeljau	Hering	Rotbarsch
N 41 820 (FBG)	N 42 350 (FiSG)	B 16 000 (FBG)
N 23 360 (FiSAg)	17 350 (FBG)	B 12 600 (FBG)
10 050 (FBAg)	N 17 300 (FBAg)	
B 345 600 (FISG)	26 140 (FiSAg)	Kohler
B 115 680 (FiSG)	N 55 380 (FiSG)	B 42 960 (FiSG)
45 040 (FBG)	N 77 240 (FBG)	11 600 (FBG)
B 37 320 (FBG)	N 14 720 (FBAg)	Makrele
26 040 (FiSG)	N 22 520 (FiSAg)	N 6 080 (FiSG)
B 5 560 (FBG)		N 3 220 (FiSG)
B 21 240 (FiSG)		

Nun haben Untersuchungen des aseptisch entnommenen Darminhaltes gezeigt, daß der Darm außerordentlich große Mengen von lebenden Bakterien enthält. Bei Kabeljau ergaben sich im Enddarm Keimgehalte von 7,8 bis 20 Millionen (FiSG) im ccm; bei Köhler waren bei gleicher Verdünnung die Keimgehalte noch so hoch; daß sich die Platten nicht auszählen ließen. Spätere Untersuchungen auf Helgoland (Kabeljau, 1936) haben gezeigt, daß der Keimgehalt in den hinteren Darmabschnitten besonders hoch, in den vorderen und mittleren Abschnitten dagegen wesentlich geringer ist.

Als Infektionsquelle während des Fangens dürfte also an erster Stelle der Darminhalt in Betracht kommen. Der hohe Grad der Be-

schmutzung der Fische geht auch daraus hervor, daß die aus dem Netzbeutel unmittelbar vor dem Öffnen des Knotens abfließenden Wassermengen (vgl. Abb. 2) von suspendierten Schmutzteilchen stark getrübt und gefärbt sind, obgleich doch der Netzbeutel beim Einholen eine Wasserschicht von mehr als 100 m durchlaufen hat und die Fischmassen sich an der Meeresoberflache unmittelbar vor dem Hochziehen des Beutels etwas auflockern und reinigen konnten. Der Keimgehalt des aus dem Netzbeutel abfließenden Wassers ist infolgedessen ebenfalls recht hoch. In der Nordsee wurden beim Heringsfang etwa 469000 (FBG und FiSG), im Eismeer bei der Bareninsel etwa 20000 (FBG) bis 132000 (FiSG) Keime je ccm ermittelt.

Aus den Untersuchungen von *Reed* und *Spence* (1923), *Stewart* (1932) und besonders von *Gibbons* (1934, Nr. 22) geht tatsachlich hervor, daß die Darmflora und die Bakterienflora des Oberflachenschleimes in zahlreichen Vertretern ubereinstimmen, eine Feststellung, die wir bestatigen konnen

Diese Auffassung der Infektionsvorgange schließt nicht aus, daß unter besonderen Verhaltnissen, etwa uber Schwammgrunden, andere zusatzliche Infektionsquellen beim Fang auftreten und das Bild der Oberflachenflora vielleicht noch mannigfaltiger gestalten

Die Veranderung der Keimgehalte wahrend des Schlachtens und Spulens der Fische an Bord des Fischdampfers

Die Fische, die mit einem Netzzug an Bord gelangen, sollen bis zum nachsten „Hol" geschlachtet, gewaschen und in den Fischbunkern verstaut sein, eine Forderung, die sich jedoch nicht immer erfullen laßt. Das Schlachten erfolgt in der Weise, daß einige Leute der Mann-



Abb 4. Das Schlachten der Fische. Man beachte die zunehmende Verschmutzung der Fische, die Farbe der Fischkörper ist dunkler und ungleichmäßiger als in Abb 3 Links am Rand (nur teilweise sichtbar) und in der Mitte Körbe zum Einsammeln der Dorschlebern zur Lebertrangewinnung Die geschlachteten Fische werden in die Spülfächer (rechts) geworfen.

schaft, zwischen oder neben den Fischmassen stehend, die Bauchhöhle jedes einzelnen Fisches mit einem kurzen Messer öffnen und die gesamten Eingeweide herausreißen. Der ausgeweidete Fisch gelangt in ein besonderes Spülfach, die wertlosen Eingeweide fallen auf die noch nicht ausgenommenen Fische, die Fischlebern werden zur Trangewinnung in Körben gesammelt (Abb. 4). Schon die oberflächliche Betrachtung dieser Vorgänge läßt vermuten, daß die mikrobiologischen Verhältnisse durchaus nicht befriedigend sein werden. Vergleicht man das Aussehen der Fische in Abb. 3 und 4, so zeigt sich schon an der Veränderung der Farbe des Fischkörpers, wie stark die Oberfläche mit den Eingeweiden beschmutzt wird. Eine nochmalige Infektion mit den Bakterien des Darminhaltes, die sich jetzt auch auf die Leibeshöhle, das Maul, die Kiemen[1] erstreckt, ist unvermeidlich und kommt in der Höhe der Keimgehalte zum Ausdruck (Tabelle II).

Tabelle II.
Keimgehalt nach dem Schlachten der Fische (Bäreninsel).
A = Körperoberfläche, J — Haut der Bauchhöhle.

Keime je qcm Körperoberfläche		
Kabeljau	Rotbarsch	Köhler
A 392 400 (FiSG)	A 20 320 (FBG)	J 6 240 (FBG)
A 137 360 (FiSG)	J 28 320 (FBG)	A 151 640 (FiSG)
22 453 (FBG)	A 27 280 (FBG)	4 760 (FBG)
A 52 080 (FBG)	J 12 200 (FiSG)	
72 720 (FiSG)		
A 22 200 (FBG)		
241 440 (FiSG)		
J 11 640 (FBG)		
18 120 (FiSG)		

Ein sorgfältiger Reinigungsprozeß wäre also dringend erforderlich, wenn die Fische nicht mit einem unerwünscht hohen Keimgehalt in den Lagerraum des Fischdampfers gelangen sollen. Für das Reinigen und Spülen sind offenbar keine allgemein gültigen Regeln festgelegt. In den meisten Fällen erfolgt es in besonderen Spülfächern. Ist das Fach mit Fischen gefüllt, so wird Seewasser hineingepumpt. Zwei oder drei Matrosen steigen in hohen weißen Gummistiefeln in das Fach. Sie haben die Aufgabe, durch Treten und Stampfen („Trampeln") die Fische zu bewegen und die Schleim-, Blut- und Schmutzmassen auf diese

[1] Die größeren Fische werden häufig in der Weise transportiert und von Fach zu Fach geworfen, daß der Matrose hinter die Kiemendeckel greift und so den Fisch aufhebt.

Weise von den Fischen abzulösen (Abb. 5). Das Wasser wird in wenigen Minuten blutig und trübe, der Reinigungseffekt wäre also an sich nicht schlecht, wenn dafür gesorgt würde, daß sofort das Schmutzwasser entfernt und durch reines Waschwasser ersetzt wird. Dies ist meist



Abb. 5. Das Spülen der Fische im Fach. Im Hintergrund das Fach wird mit Seewasser gefüllt Im Vordergrund, gefülltes Spülfach, das Schmutzwasser läuft langsam nach unten ab

Tabelle III. Keimgehalt nach dem Spulen der Fische.
B = Bareninsel, N = Nordsee. A und J wie in Tabelle II. „Fach" und „Korb" geben an, ob die Fische im Spulfach oder im Korb gespult worden sind.

Keime je qcm Körperoberfläche								
Kabeljau (B)			Rotbarsch (B)			Köhler (B)		
A	72 240 (FiSG)	Fach	A	7 440 (FBG)	Fach	A	126 320 (FiSG)	Fach
A	20 800 (FiSG)	„	J	2 880 (FBG)	„		9 600 (FBG)	„
A	160 880 (FGB)	„	A	11 840 (FBG)	„			
	216 800 (FiSG)	„	J	10 660 (FiSG)	„			
J	23 760 (FBG)	„						
	35 080 (FiSG)	„						
A	5 720 (FBG)	„						
	18 720 (FiSG)	„						
A	78 120 (FBG)	„						
	37 640 (FiSG)	„						
J	13 920 (FBG)	„						
	20 000 (FiSG)	„						

Keime je qcm Korperoberfläche					
Hering (N)			Makrele (N)		
A	40 880 (FiSG)	Korb	A	6 560 (FiSG)	Fach
A	40 760 (FBG)	„	A	5 960 (FiSG)	„
A	10 826 (FBG)	Fach	A	19 860 (FiSG)	„
A	15 700 (FBG)	„	A	21 060 (FiSG)	„
A	2 020 (FBAg)	Korb			
A	17 640 (FiSAg)	„			

nicht der Fall, die Wassermassen sickern vielmehr ziemlich langsam durch den Fischhaufen hindurch und fließen **unten** durch die Spalte zwischen den Schottenbrettern und der Deckoberfläche ab. Dabei dürfte der größere Teil des losgelösten Schmutzes wieder auf den Fischen abgelagert werden.

Eine andere Art des Spülvorganges, die aber nur bei kleineren Fängen durchführbar ist, besteht darin, daß die Fische nach dem Ausnehmen in Körbe gelangen und hier kräftig durchgespült werden. Das Wasser hat Gelegenheit, sofort nach allen Seiten abzufließen. Man sollte erwarten, daß unter diesen Umständen der Reinigungseffekt besser ist; aus den wenigen, bis jetzt vorliegenden Werten geht dies jedoch nicht hervor (Tabelle III, S. 216).

Die mikrobiologische Untersuchung der im Fach gespülten Fische ergibt sowohl auf der Körperoberflache wie in der Bauchhöhle Keimgehalte, die in manchen Fällen zwar gegenüber den geschlachteten Fischen eine Verminderung erkennen lassen, in anderen Fällen dagegen der gleichen Größenordnung angehören oder sogar noch höher sind (Tabelle III).

Die Entwicklung der Keimgehalte während des Transportes der Fische im Dampfer.

Nach dem Spülen werden die Fische in Weidenkörben in die Fischlagerräume im Vorderschiff hinuntergelassen, die eine Höhe von etwa 4 m haben und sich über den ganzen Querschnitt des Dampfers erstrecken.

Rechts und links von einem schmalen Mittelgang werden die Fische, möglichst nach Arten sortiert, in den einzelnen Abteilen (jederseits etwa 8 bis 14) in der Weise aufgestapelt, daß zerkleinertes Eis und Fische schichtenweise abwechseln und die ganze Höhe des Fischraumes durch zwischengeschaltete Schottenbretter in zwei bis drei Abschnitte zerlegt wird. Durch das Einschieben von Schottenbrettern wird erreicht, daß der Druck der Fischmassen aufeinander nicht zu groß wird. Schließlich wird gegen Ende der Fangzeit auch der Mittelgang in derselben Weise aufgefüllt. Für eine sorgfältige Einlagerung der Fische sind die beiden Steuerleute verantwortlich.

Fertigt man sich einen Lagerplan an, in dem die Verstauung jedes einzelnen Hols angemerkt ist, so hat man beim Löschen der Ladung die Möglichkeit, Fische vom ersten bis zum letzten Fangtag miteinander zu vergleichen. Für die Beurteilung der Haltbarkeit und Qualität bei der Ankunft des Dampfers im Hafen ist wichtig, daß Reisedauer und Zahl der Fangtage an den einzelnen Fangplätzen verschieden sind (Tabelle IV S. 218). Das mittlere Gewicht einer Fischdampferladung bewegt sich nach den statistischen Angaben für 1928 bis 1932 zwischen 340 Ztr. (Nordsee) und 1640 Ztr. (Bäreninsel). Es kann bei voller Raumausnutzung 3000 Ztr. überschreiten.

Tabelle IV.
Reisetage und Zahl der Fangtage an den einzelnen Fangplätzen (Durchschnittswerte).

	Nordsee	Island	Bäreninsel	Barentssee
Reisedauer*	11,5 Tage	18,8 Tage	20,5 Tage	24,2 Tage
Fangtage	6,9 „	7,1 „	7,0 „	6,8 „
Mittlere Dauer der Hin- oder Rückreise . . .	1,6 „	4,9 „	6,2 „	7,9 „

* Die Zahl der jährlichen Reisen beträgt bei kleineren Dampfern, die nur in der Nordsee eingesetzt werden, im Durchschnitt 25, bei größeren Dampfern, die je nach der Jahreszeit in der Nordsee und an den nordischen Fangplätzen fischen, 14 bis 18.

Aus den Untersuchungen an gespülten Fischen ging hervor, daß die Fische mit einem Keimgehalt eingelagert werden, der sich zwischen $2 \cdot 10^3$ und $2 \cdot 10^5$ bewegt und meist bei 10^4 lebenden Bakterien je qcm liegt. Bei Schlachtfleisch beträgt der Oberflächenkeimgehalt je nach der Jahreszeit 10^2 bis 10^4 Keime je qcm. Während Fleisch in Luft lagern kann, die Oberflächen also Gelegenheit haben, etwas abzutrocknen, muß bei Fisch dafür gesorgt werden, daß die Oberfläche ständig naß bleibt, weil sonst sehr rasch eine qualitätsmindernde Verfärbung und Austrocknung einsetzt. Bei der Lagerung mit Eis im Fischdampfer wird die Oberfläche ständig von dem abtropfenden Schmelzwasser bespült, das sich, nachdem es den Fischstapel durchlaufen hat, im Kielraum des Schiffes, in der Bilge, ansammelt. Das Bilgewasser wird durch Auspumpen aus dem Dampfer entfernt. In der Bilge spielen sich ständig Fäulnisprozesse ab, da sich das Wasser in den Fischstapeln mit Nährstoffen und Keimen angereichert hat. Die Temperatur innerhalb der Fischstapel beträgt bei Frischfischen nach Messungen von *Loeser*[1] etwa $+ 0{,}5^0$ C, die Lufttemperatur nach Schließen der Ladeluken etwa $+ 1^0$ C.[2]

Die mikrobiologischen Vorgänge setzen sich zusammen aus der Vermehrung der bereits auf den Fischen vorhandenen und der aus dem Eise und dem Schmelzwasser stammenden Keime. Der Keimgehalt des Eises darf nicht vernachlässigt werden. Die deutsche Hochseefischerei verwendet teils Kunsteis aus Eisfabriken der Heimathäfen, teils norwegisches Natureis, das auf der Ausreise zur Bäreninsel und zum Weißen Meer in Tromsö, Harstadt oder einem anderen Hafen geladen wird. Unsere orientierenden Untersuchungen über den Keimgehalt beider Eisarten lassen erwarten, daß die Frage, ob Natur- oder Kunsteis

[1] Noch nicht veröffentlicht. — [2] Bei Heringsfangreisen kann die Temperatur im Fischstapel infolge der Verwendung von Kochsalz als Zusatz zum Eis unter $\pm 0^0$ C sinken.

vorzuziehen sei, nicht eindeutig entschieden werden kann (Tabelle V). Es kommt auf die Qualität des Wassers an, vor allem aber auch auf die Behandlung des Eises beim Zerkleinern und beim Transport zum Fischdampfer. *Loeser* hat inzwischen diese Anregung aufgegriffen und eine Reihe von vergleichenden Untersuchungen durchgeführt.

Tabelle V. Keimgehalt verschiedener Eisproben.
Bei samtlichen Proben waren im Sediment des Schmelzwassers neben groben Schmutz- und Sägemehlteilchen einzelne Holzzellen, Pollenkörner, Pilzhyphen vorhanden.

Keime je ccm Schmelzwasser			
Natureis H*	Kunsteis I	Kunsteis II	Kunsteis III
42 560 (FBG)	29 656 (FBG)	6 005 (FBG)	380 (FBG)
56 832 (FiSG)	33 070 (FBG)	6 592 (FBG)	682 (FBG)
45 545 (FiSG)	20 480 (FiSG)	8 790 (FBG)	270 (FBG)
	18 080 (FiSG)	6 448 (FiSG)	485 (FBG)
	33 860 (FiSG)	6 958 (FiSG)	778 (FiSG)
		6 480 (FiSG)	376 (FiSG)
			460 (FiSG)
			250 (FiSG)

* Die Natureisprobe H stammte aus einem Teich, der im Sommer als Viehtränke dient und im September durchschnittlich 589 Keime im ccm enthielt (FBG und FiSG).

Inwieweit auch der Keimgehalt der Fischräume, Körbe, Schottenbretter, die nach jeder Reise sorgfältig gereinigt werden sollten, eine Rolle spielt, wurde noch nicht untersucht. Wir vermuten, daß dieser Infektionsquelle keine große Bedeutung zukommt, sofern Raumauskleidung und Schottenbretter unbeschädigt sind. Meist jedoch hat die aus gestrichenem Holz bestehende Raumauskleidung infolge der unvermeidlichen rauhen Beanspruchung stark gelitten. Ein widerstandsfahiger Wandbelag, der auch den sonst zu stellenden Anforderungen genügt, muß noch gefunden werden.

Die Bakterienflora der eingelagerten Fische besteht also zum größten Teil aus Darmbakterien und aus Wasserbakterien. Zweifellos überwiegen kryophile Arten und Stämme, deren Wachstum durch Schmelzwasser- und Lufttemperaturen um + 1° C noch keineswegs behindert wird. Von den Oberflachen ausgehend, beginnt der Zersetzungsprozeß der Fischmuskulatur bereits während der Heimreise des Dampfers. Die Zersetzung kann sogar schon so weit fortschreiten, daß nach dem Löschen Teile der Ladung nur noch zur sofortigen Verarbeitung zugelassen oder als untauglich für die menschliche Ernährung beschlagnahmt werden.

Wie hoch diese Verluste eigentlich sind, läßt sich aus den statistischen Unterlagen nicht ohne weiteres entnehmen. Einen gewissen Anhalt gibt

der Anteil der Fänge, der in die Fischmehlfabriken wandert (Tabelle VI). Hierbei handelt es sich um Ware, die entweder gefährdet oder schon verdorben war, außerdem aber auch um solche, die bei noch einwandfreier Qualität keinen Abnehmer fand.

Tabelle VI. Verluste nach Menge und Wert durch Verderb und durch ungenügende Marktregelung (Statistik der gesamten deutschen Seefischerei).

	1932	1933	1934	Wert je kg
Gesamte Anlandung	281 800 t 42,7 Mill. RM	316 200 t 47,4 Mill. RM	312 000 t 52,8 Mill. RM	15—16 Pf.
Klippfischwerke	40 t 2000 RM	5700 t 118 000 RM	4600 t 98 000 RM	2—5 Pf.
Fischmehlfabriken	9500 t 12 000 RM	17 100 t 24 200 RM	16 700 t 26 400 RM	0,12—0,15 Pf.

Tabelle VII.

Keimgehalt der Fische im Hafen. A und J wie in Tabelle II, S. 215. B = Häreninsel, W = Weißes Meer (Barents-See), Is = Island.

Keimgehalt je qcm Körperoberfläche		
Kabeljau	**Rothbarsch**	**Schellfisch**
B: A 9 483 520 (FBG)	B: A ~ 322 140 000 (FiSG)	W: A 3 450 000 (FBG)
3 593 293 (FiSG)	J 2 573 653 (FBG)	5 444 000 (FiSG)
J 4 406 133 (FBG)		2 264 000 (FBG)
977 120 (FiSG)	B: A 60 231 600 (FiSG)	2 224 000 (FiSG)
	J 8 889 920 (FBG)	J 4 320 000 (FiSG)
B: A 5 365 086 (FBG)		3 090 000 (FBG)
15 366 120 (FiSG)	B: A 7 792 200 (FiSG)	381 800 (FiSG)
	J 1 317 930 (FBG)	343 119 (FBG)
B: A ~ 107 251 200 (FBG)		
~ 222 381 600 (FiSG)	**Kohler**	W: J 253 200 (FBG)
J 9 731 400 (FBG)		352 000 (FiSG)
11 084 640 (FiSG)	B: A 117 360 (FBG)	80 800 (FiSG)
	3 478 160 (FiSG)	75 000 (FBG)
B: A 24 359 400 (FiSG)		121 000 (FBG)
J 8 985 600 (FBG)		450 800 (FiSG)
		11 200 (FiSG)
Is: A 2 474 000 (FBG)		9 600 (FBG)
1 300 800 (FBG)		
639 600 (FBG)		
554 900 (FBG)		
J 94 880 (FBG)		
A 1 316 000 (FiSG)		
1 361 600 (FiSG)		
~ 5 548 800 (FiSG)		
1 402 400 (FiSG)		
J ~ 4 392 800 (FiSG)		

Die Zunahme der Keimzahlen ergibt sich aus einem Vergleich der Werte für gespülte Fische mit den Zahlen, die man beim Löschen des Dampfers feststellt. Auch hier verhalten sich wie auf allen übrigen Abschnitten des Weges, den der Fisch durchläuft, die bis jetzt untersuchten Fischarten annähernd einheitlich (Tabelle VII S. 220). Dagegen kommen Qualitätsunterschiede ein und derselben Fischart von verschiedenen Fangplätzen deutlich in der Höhe des Keimgehaltes zum Ausdruck, wenn man z. B. die Zahlen für Kabeljau von der Bäreninsel und von Island vergleicht (Tabelle VII). Ist bekannt, an welchem Tag der betreffende Fisch gefangen wurde, so läßt sich auch der Einfluß einer verschieden langen Reisedauer ermitteln (Tabelle VIII). Auch hier fallen stets einzelne Proben durch abnorm hohe oder niedrige Keimgehalte auf.

Tabelle VIII. Einfluß der Reisedauer auf den Keimgehalt.
A und J vgl. Tabelle II S. 215.

	Keimgehalt in Millionen je qcm		
	Lagerdauer im Fischraum		
	14 Tage	10 Tage	7 Tage
Kabeljau A	24,4 (FiSG)	15,4 (FiSG) 5,4 (FBG)	9,5 (FBG) 3,6 (FiSG)
Kabeljau J	9,0 (FBG)	9,7 (FBG) 11,1 (FiSG)	4,4 (FBG) 1,0 (FiSG)

Die Behandlung der Fische im Hafen und deren Einfluß auf den Oberflächenkeimgehalt.

Das Löschen der Dampfer beginnt am Tag des Einlaufens gegen 22 Uhr abends und dauert bis in die frühen Morgenstunden. Die Fische werden in den Auktionshallen, nach Dampferladungen und Arten getrennt, in flachen Holzkisten aufgestellt, die je 120 Pfund fassen und am oberen Ende eine etwa 5 cm breite Leiste haben. Die Versteigerung beginnt vormittags 7 Uhr und ist gegen 10 Uhr meist beendet. Während der Auktion stehen die Händler vielfach *auf* den Kistenleisten. Es ist unvermeidlich, daß dabei eine Verunreinigung der Fische durch Straßenschmutz stattfindet, der von den Schuhen abfällt, ganz abgesehen von der Infektion aus der stark bewegten Luft. Der Fisch gelangt dann auf das Lager des Großhändlers. Während dieses ganzen Abschnittes, der einen Zeitraum von etwa 5 bis 13 Stunden umfaßt, steht der Fisch ohne Eis; höchstens beim Transport durch die Stadt zum Großhändler werden die gefüllten Kisten durch eine dünne Eislage und durch Zeltplanen geschützt.

Trotz diesen recht ungünstigen Verhältnissen steigen die Keimzahlen nur unerheblich an, wie aus Bestimmungen unmittelbar nach dem Löschen und nach dem Eintreffen der Fische beim Großhändler

hervorgeht (Tabelle IX). Es scheint, daß entweder die Besiedelung der Oberflächen vorläufig einen Höhepunkt erreicht hat, oder daß die jetzt hinzukommenden Bakterien sich zunächst an das Substrat anpassen müssen.

Tabelle IX. Keimgehalt in der Auktionshalle Wesermünde und nach dem Transport zum Fischhändler in Wesermünde-Lehe. (Kabeljau, Bäreninsel.) A und J wie in Tabelle II.

Keimgehalt in Millionen je qcm			
Auktionshalle		Fischhändler	
A 0,6 (FBG)	J 0,09 (FBG)	A 2,3 (FBG)	J 0,3 (FBG)
0,9 (FBG)	0,04 (FBG)	7,5 (FBG)	0,2 (FBG)
1,0 (FiSG)	0,05 (FiSG)	7,5 (FiSG)	0,1 (FiSG)
~22,9 (FiSG)	15,9 (FiSG)	2,0 (FBG)	7,5 (FiSG)
14,8 (FiSG)	16,9 (FiSG)	6,7 (FiSG)	4,3 (FBG)
4,1 (FBG)	0,07 (FBG)	2,4 (FiSG)	4,5 (FiSG)
		2,3 (FBG)	1,9 (FBG)
		1,7 (FiSG)	
		2,7 (FBG)	

Die weiteren Veränderungen der Keimgehalte entziehen sich noch einer einwandfreien Kontrolle. Es ist nur festzustellen, daß der Fisch, der im Schaufenster der Einzelhändler erscheint, vielfach besser aussieht als der Fisch, der aus dem Dampfer ausgeladen wurde, was man darauf zurückführen muß, daß der Fisch in der Zwischenzeit kräftig gewaschen und abgeschleimt worden ist. Ob dieser Behandlung nur der Wert einer allgemeinen hygienischen Maßnahme und einer aus psychologischen Gründen für den Verkauf erforderlichen Schönung zukommt, oder ob hierdurch tatsächlich eine Verbesserung der Haltbarkeit erzielt wird, läßt sich noch nicht bindend entscheiden. Nach den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen aus vergleichenden Untersuchungen, die an mit Salz- oder Süßwasser gewaschenen, abgeschleimten und gar nicht behandelten Fischen in Karlsruhe und Wesermünde unter genau festgelegten Zeit- und Lagerungsbedingungen ausgeführt sind, scheint eher das erstere der Fall zu sein. Die Tiefeninfektion und das Verderben schreiten fort, obgleich der Keimgehalt der Oberfläche vorübergehend gesenkt worden ist.

Die Höhe der Oberflächenkeimgehalte im Binnenlande.

Über die Veränderungen der Keimgehalte während des Bahntransportes liegen noch keine Zahlen vor.

Die Untersuchungen beim Einzelhändler in Karlsruhe wurden in der Weise durchgeführt, daß der Fisch sofort nach dem Eintreffen, ferner nach einer ein- bis viertägigen Lagerdauer im Eiskasten des Einzelhändlers zur Untersuchung gelangte (Tabelle X). Die Lufttemperatur im Eiskasten schwankte zwischen + 3 und + 7° C. Die Keimgehalte

Tabelle X. **Entwicklung der Keimgehalte beim Fischhändler** (Versuche mit Kabeljau, Karlsruhe 1933).

Die Keimgehalte sind in Millionen je qcm Oberfläche angegeben. Jede Zahl entspricht einer Fischprobe. Die römische Ziffer bedeutet den Monat, A = Außenhaut, J = Innenhaut der Bauchhöhle. Das Alter der Fische wird vom Tage des Eintreffens beim Fischhändler an gerechnet. Die Entfernung von Wesermünde beträgt 624 km.

Alter des Fisches				
bis 1 Tag		bis 2 Tage	bis 3 Tage	bis 4 Tage
III. A 4,5 (FBG) 3,9 (FBG) 5,4 (FiSG) 3,5 (FiSG) 6,2 (FBG) 7,4 (FBG) 30,4 (FiSG) 26,9 (FiSG) J 0,1 (FBG) 0,03 (FBG) 1,1 (FiSG) 0,3 (FiSG) IV. A 19,8 (FBG) 7,3 (FBG) 22,0 (FiSG) 20,6 (FiSG) 2,2 (FBG) 4,3 (FBG) 0,3 (FiSG) 2,8 (FiSG) J 4,3 (FBG) 1,0 (FiSG) 0,1 (FBG) 0,1 (FBG) 0,7 (FiSG) 0,2 (FiSG)	V. A 2,9 (FBG) 0,7 (FBG) 0,3 (FBG) 2,1 (FiSG) 1,3 (FiSG) 3,1 (FiSG) 13,5 (FiSG) 12,2 (FiSG) 2,2 (FBG) 4,0 (FBG) 9,6 (FiSG) 6,7 (FiSG) J 0,4 (FBG) 2,0 (FiSG) 6,5 (FiSG) 7,5 (FiSG) 1,4 (FBG) 2,0 (FBG) 0,2 (FiSG) 0,07 (FiSG) VI. A 5,7 (FBG) 7,6 (FBG) 0,5 (FBG) 0,4 (FBG) 6,9 (FiSG) 7,6 (FiSG) 1,3 (FiSG) 1,5 (FiSG) J 1,7 (FBG) 0,8 (FBG) 0,5 (FBG) 2,9 (FBG) 0,8 (FiSG) 3,5 (FiSG) 1,8 (FiSG) 1,8 (FiSG)	V. A 32,2 (FBG) 26,2 (FBG) J 15,2 (FBG) 9,3 (FBG) VI. A 5,1 (FiSG) 6,2 (FiSG) 17,2 (FiSG) 5,3 (FiSG)	Fisch riecht stark nach Ammoniak, Haut stellenweise mit schleimigem Belag bedeckt IV. A 54,1 (FBG) 33,0 (FBG) 100,4 (FiSG) 27,0 (FiSG) J 2,1 (FBG) 2,2 (FBG) 6,8 (FiSG) 16,2 (FiSG) Fisch riecht stark V. A 10,7 (FBG) 34,0 (FBG) J 12,5 (FBG) 11,0 (FBG) VI. A 0,8 (FBG) 1,1 (FBG) 0,4 (FBG) 0,4 (FBG) 1,5 (FiSG) 2,8 (FiSG) 3,7 (FiSG) 0,5 (FiSG)	Fisch riecht nach Ammoniak V. A 11,8 (FBG) 21,5 (FBG) 151,6 (FiSG) 25,0 (FiSG) J 4,0 (FBG) 5,9 (FBG) 1,8 (FiSG) 3,4 (FiSG)

bewegen sich anfangs entweder auf gleicher Höhe wie bei den Fischen in den Auktionshallen des Fischereihafens oder sind sogar niedriger, was auf die Nachwirkung des wiederholten Abwaschens und Abschleimens zurückzuführen ist. Auch hier sind die Streuungen sehr hoch.

In den folgenden Tagen geht der Anstieg jedoch schnell vonstatten, wobei die Streuung nach oben immer mehr zunimmt. Schon am dritten Tage ist der Fisch schleimig und unansehnlich geworden oder erweist sich durch Verfärbung, Geruch und Erweichung der Muskulatur als verdorben. Daß der Fisch an der Grenze seiner Haltbarkeit steht, zeigt auch seine Empfindlichkeit gegenüber vorübergehenden Temperatursteigerungen. Eine ein- bis zweistündige Erwärmung auf etwa 30° C kann eine Verdopplung, mindestens aber eine erhebliche Zunahme der Keime bewirken (Tabelle XI). Solche Temperaturanstiege sind besonders in den Sommermonaten unvermeidlich, wenn der Fisch in die einzelnen Haushaltungen gebracht und bis zur Zubereitung der Lufttemperatur ausgesetzt wird.

Tabelle XI.

Wirkung einer vorübergehenden Erwärmung der Fische auf den Keimgehalt (Kabeljau, Karlsruhe 1933). Zahlen in Millionen je qcm.

Alter des Fisches bis 1 Tag		Alter des Fisches bis 2 Tage	
Fischhändler	Thermostat	Fischhändler	Thermostat
	$1\frac{1}{4}$ Std. bei 31° Geruch nicht verändert		$1\frac{1}{2}$ Std. bei 33° schwacher Ammoniakgeruch
V: A 13,5 (FiSG) 12,2 (FiSG) J 6,5 (FiSG) 7,5 (FiSG)	A 11,6 (FiSG) 12,0 (FiSG) J 6,2 (FiSG) 1,5 (FiSG)	V: A 32,2 (FBG) 26,2 (FBG) J 15,2 (FBG) 9,3 (FBG)	A 55,9 (FBG) 41,6 (FBG) J 24,6 (FBG) 49,0 (FBG)
			$1\frac{1}{2}$ Std. bei 31° Fleisch gelblich verfärbt, schwacher Ammoniakgeruch
		VI: A 5,1 (FiSG) 6,2 (FiSG) 17,2 (FiSG) 5,3 (FiSG)	A 4,5 (FiSG) 9,1 (FiSG) 23,9 (FiSG) 9,7 (FiSG)

Alter des Fisches bis 3 Tage	
Fischhändler	Thermostat
Fisch riecht stark	$1\frac{1}{2}$ Std. bei 31° Geruch nach Ammoniak
V: A 10,7 (FBG) 34,0 (FBG) J 12,5 (FBG) 11,0 (FBG)	A 19,7 (FBG) 54,9 (FBG) J 48,7 (FBG) 64,4 (FBG)

Diskussion der Ergebnisse.

Überblicken wir nochmals den gesamten Weg, den der Fisch durchläuft, so steht fest, daß vom Standpunkt des Mikrobiologen aus die Behandlungsweise des Fisches fast in allen Abschnitten unbefriedigend

ist, und daß der Seefisch nicht mit der Sorgfalt behandelt wird, die ein so leicht verderbendes Lebensmittel verlangt.

Bei dem Versuch, Abhilfe zu schaffen, muß davon ausgegangen werden, daß grundlegende Veränderungen in der Behandlung der Fische an Bord der Fischdampfer heute nicht möglich sind. Die räumlichen Verhältnisse, die jetzt schon vorhandene Überlastung der Mannschaft während der Fangtage und die Forderung, den Laderaum bei möglichst kurzer Reisedauer des Fischdampfers voll auszunutzen, lassen es nicht zu. Schon durch geringfügige Veränderungen des jetzt an Bord üblichen Arbeitsganges dürfte sich indessen eine Verbesserung im mikrobiologischen Zustand der Fische erzielen lassen.

Dagegen besteht bei der Behandlung der Fische an Land eine größere Bewegungsfreiheit. Hier müßte vor allem die Unterbrechung der Kühlkette vermieden werden, die sicher einen ungünstigen Einfluß auf die Haltbarkeit hat, selbst wenn die Oberflächenkeimgehalte nicht wesentlich ansteigen. Das Gegenargument, daß die Mehrzahl der vorhandenen Bakterien ja kryophile, gerade an die niederen Temperaturen im Wasser und im Fischdarm angepaßte Keime sind, ist nicht stichhaltig, da auch bei zahlreichen Kryophilen das Temperaturoptimum des Wachstums zwischen + 10 und + 20° C liegt. Außerdem setzt gerade jetzt die Infektion mit Bakterien der mesophilen Temperaturgruppe ein. Um die Veränderung der Fischqualität in diesem Abschnitt noch genauer aufzuklären, werden wir den Vorgang der Tiefeninfektion in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgen; außerdem wird die von *Lücke* und *Geidel* (1935) ausgearbeitete Methode zur chemischen Untersuchung des Frischezustandes herangezogen werden.

Verstärkte Anwendung der Kälte muß auch für die Behandlung der Fische beim Groß- und Kleinhändler und während des Bahntransportes gefordert werden. *Kaess* und *Loeser* haben in Gemeinschaft mit der Reichsbahnverwaltung bereits Untersuchungen über die Lagerungsbedingungen in den Kühlwagen der Reichsbahn eingeleitet.

Es ist jedoch sehr fraglich, ob sich allein durch diese Maßnahmen schon eine erhebliche Verbesserung der Fischqualität im küstenfernen Binnenland erzielen lassen wird, oder ob man auch auf dem Gebiet der Fischlagerung zu „kombinierten Methoden" [*Plank* (1933), *Schwartz* (1935)] übergehen muß. Auf keinen Fall wird ein rechtzeitiger Ausbau der Gefrierverfahren hierdurch überflüssig gemacht.

Aus den statistischen Unterlagen der Gesundheitsbehörden geht hervor, daß pathogene Bakterien bei der Fischzersetzung seltener auftreten als z. B. bei Fleisch und Wurst. Diese Feststellung darf nicht dazu benutzt werden, alle Vorschläge zu einer sorgfältigeren Behandlung

der Fische für überflüssig zu erklären. Denn unsere Bestrebungen sind ja auf Verbesserung der Qualität und Verminderung der Verluste durch Verderb gerichtet, wobei es gleichgültig ist, ob die Zersetzung der Fischmuskulatur durch menschenpathogene oder durch nichtpathogene Bakterien der Eiweißfäulnis verursacht wird, weil in beiden Fällen der Fisch für die menschliche Ernährung unbrauchbar wird.

Der Anfangskeimgehalt der geschlachteten Fische ist mit etwa 10^4 Keimen (Abb. 6, S. 227) im Durchschnitt größer als bei Fleisch. Seine Höhe könnte für die Haltbarkeit des Fisches ähnliche Bedeutung haben, wie es bei Fleisch der Fall ist [*W. Schwartz* und *W. Bender* (1936)], bei dem sich Unterschiede so spät ausgleichen, daß niedriger Anfangskeimgehalt eine bessere Haltbarkeit bewirkt. Es bedarf allerdings noch der Untersuchung, wieweit bei einer erfolgreichen Verzögerung der Bakterienvermehrung etwa die autolytische Zersetzung der Fischmuskulatur praktische Bedeutung erlangt. Die Infektion während des Fangens und Hievens wird sich kaum erheblich vermindern lassen. Um so mehr Wert muß darauf gelegt werden, daß eine weitere Infektion der Fische beim Schlachten verhütet und die Säuberung der Fische gründlicher durchgeführt wird. Es ist ohne weiteres möglich, die Fische vor einer Beschmutzung durch die Eingeweide zu schützen. Ebenso läßt sich der Spülvorgang, auch wenn er wie bisher im Spülfach ausgeführt wird, günstiger gestalten. Einzelne Reedereien haben bereits befriedigende Versuche in dieser Richtung unternommen. Es wird voraussichtlich gelingen, den Keimgehalt unter den der noch nicht geschlachteten Fische herabzudrücken.

Um eine einwandfreie Beschaffenheit des Eises zu sichern, werden von Zeit zu Zeit mikrobiologische Kontrollen unerläßlich sein. Entscheidend ist der Keimgehalt des zerkleinerten Eises beim Eintreffen am Dampfer.

Die Temperatur- und Lagerungsverhältnisse im Fischdampfer lassen sich ebenfalls verbessern. Seit mehreren Jahren wird von den deutschen Fischdampfern sogenannter „Kistenfisch" an den Markt gebracht, der nicht lose im Fischraum, sondern mit Eis in Holzkisten verpackt wird, die im Fischraum aufgestapelt werden. Kistenfisch erzielt auf der Auktion stets höhere Preise. Die mikrobiologische Untersuchung hat ergeben, daß der Keimgehalt niedriger ist als bei Vergleichsfischen aus dem Fischraum (Tabelle XII, S. 228). Leider ist diese Behandlungsweise für Massenfänge zu umständlich. Dagegen kann man die Temperaturverhältnisse schon durch Zusatz von Kochsalz zum Eis verbessern. Einige Versuche, bei denen zunächst Kistenfisch, wie bei den Untersuchungen über die Eiweißzersetzung von *Lücke* und *Geidel*, mit einem Eis-Kochsalzgemisch behandelt war, haben günstige Ergeb-

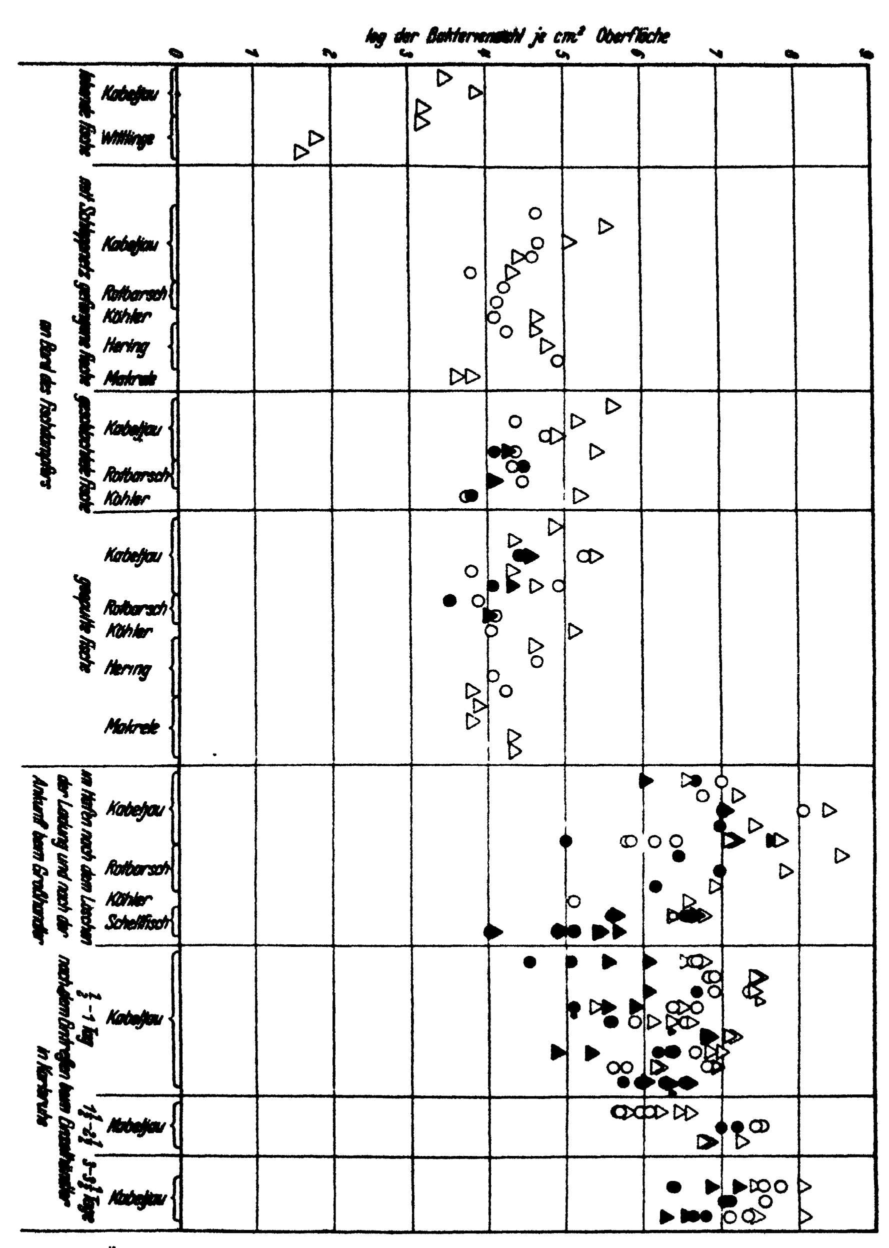


Abb. 6. Übersicht über die Entwicklung der Oberflächenkeimgehalte von der See bis zum Fischhändler im Binnenland.

Zeichenerklärung: ○ Körperoberfläche: FBg
△ Körperoberfläche: FISG
● Bauchhöhle: FBG
▲ Bauchhöhle: FISG.

nisse gezeitigt (Tabelle XII). Auch bei der Lagerung der Fische an Land werden Vermehrung der Bakterien und Eiweißabbau im Eis-Salz-Gemisch verzögert (Tabelle XIII).

Tabelle XII.

Keimgehalt je qcm bei Lagerung im Fischraum des Dampfers in Eis und in Eis-Salz-Gemisch (6 bis 8 % NaCl). B = Bäreninsel, Kabeljau. NK = Norwegische Küste, Schellfisch.

Fischraum (nur Eis)	Kistenfisch (nur Eis)	Kistenfisch (Eis-Salz-Gemisch)
B: A 24 859 400 (FiSG) 15 366 120 (FiSG) 2 593 293 (FiSG)	A 9 570 960 (FiSG)	A 473 760 (FiSG)
J 8 985 600 (FBG) 9 731 400 (FBG) 4 406 133 (FBG)	J 108 300 (FBG)	J 523 860 (FBG)
NK: A 1 418 667 (FBG) 293 667 (FiSG)	A 133 334 (FBG) 173 334 (FiSG)	A 62 667 (FBG) 150 000 (FiSG)

Tabelle XIII.

Einfluß der Lagerung in Eis und Eis-Salz-Gemisch auf die Entwicklung der Keimgehalte (Versuche an Land).

Schellfisch von der norwegischen Küste, am 31. Januar 1935 gefangen, am 3. Februar im Hafen eingetroffen. Der Fisch war schon während der Reise in entsprechender Weise in Eis bzw. Eis-Salz-Gemisch gelagert worden.

(Keimgehalt in 1000 Bakterien je qcm Körperoberfläche.)

Datum	Nach dem Löschen am 4. II.	6. II.	8. II.
Eiskasten	1 419 (FBG) 294 (FiSG)	1 425 (FBG) 1 589 (FiSG)	8 257 (FBG) 11 193 (FiSG)
Kasten m. Eis-Salz-Gemisch	63 (FBG) 150 (FiSG)	242 (FBG) 287 (FiSG)	272 (FBG) 361 (FiSG)

Datum	11. II.	13. II.	15. II.
Eiskasten	19 450 (FBG) 123 080 (FiSG)	∞	
Kasten m. Eis-Salz-Gemisch	1 572 (FBG) 3 536 (FiSG)	2 133 (FBG) 3 871 (FiSG)	21 398 (FBG) 111 460 (FiSG)

Wieweit die Reinigung der Gerätschaften und der Fischräume auf den Dampfern den hygienischen Anforderungen entspricht, ließe sich in Anlehnung an die in Brauereiräumen angewandten Verfahren der biologischen Betriebskontrolle leicht feststellen.

Zusammenfassung.

1. Als Hauptinfektionsquelle bei dem Fang der Fische mit dem Grundschleppnetz muß der Darminhalt der Fische und die Infektion der Fischoberflächen durch Darmbakterien angesehen werden.

2. Als zusätzliche Infektionsquellen kommen in Frage der Keimgehalt des Meerwassers und des Meeresbodens, des Eises und der Fischräume.

3. Natur- und Kunsteis verschiedener Herkunft zeigen in bezug auf ihren Keimgehalt erhebliche Unterschiede. Neben dem Keimgehalt des zur Eisgewinnung benutzten Wassers dürfte die Behandlung des Eises beim Zerkleinern und beim Transport zum Dampfer großen Einfluß auf den Keimgehalt des gebrauchsfertigen, grobkörnigen Eises haben.

4. Die Keimgehalte des Meerwassers und des Meerbodens haben im allgemeinen keine praktische Bedeutung; der Keimgehalt der Fischräume auf dem Dampfer hängt ab von der Gründlichkeit der Reinigung vor Beginn der Reise und von dem Erhaltungszustand der Wände und Schottenbretter. Der Mensch wirkt nicht als eigentliche Infektionsquelle, sondern trägt nur zur Ausbreitung der Keime bei.

5. Die Vorgänge beim Schlachten und Spülen der Fische befriedigen in mikrobiologischer Hinsicht nicht. Es ist bei der jetzt üblichen Behandlungsweise nicht möglich, den Keimgehalt der gespülten Fische mit Sicherheit unter den Keimgehalt der geschlachteten Fische zu senken.

6. Die Kühltemperatur im Fischraum reicht nicht aus, um unter allen Umständen eine einwandfreie Haltbarkeit der Fische bis zur Ankunft im Hafen, d. h. während eines Zeitraumes bis zu 14 Tagen, zu sichern.

7. Die Besiedelung der Fischoberflächen mit Bakterien hat beim Löschen der Fischladung einen vorläufigen Höhepunkt erreicht. Selbst die etwa zwölfstündige Unterbrechung der Kühlkette nach dem Löschen, während der Auktion und während des Transportes zum Großhändler hat nicht den Anstieg der Keimzahlen zur Folge, den man eigentlich erwarten sollte.

8. Das Abschleimen der Fische bewirkt zwar eine erhebliche Verminderung des Oberflächenkeimgehalts, der Einfluß dieser Maßnahme auf Tiefeninfektion und Haltbarkeit ist jedoch noch zweifelhaft.

9. Kistenfisch und Fisch in Eis-Salz-Gemischen weisen bei der Ankunft im Hafen einen geringeren Oberflächenkeimgehalt auf als die im Fischraum mit Eis ohne Salzzusatz verstauten Fische.

10. Der Fisch trifft im küstenfernen Binnenland unter den jetzigen Bedingungen erst im Grenzbereich seiner Haltbarkeit ein und ist in diesem Zustand selbst gegenüber vorübergehenden Temperatursteigerungen sehr empfindlich.

Literatur.

F. Benedict, Ergebn. d. Physiol. **36**, 300, 1934. — *N. E. Gibbons*, Contrib. Canad. Biol. and Fisheries 8, Nr. 22, Nr. 23, 1934. — *F. Lücke* u. *W. Geidel*, Zeitschr. f. Unters. d. Lebensmittel 70, H. 6, 1935. — *R. Plank*, Gesundheits-Ingenieur **56**, 413, 1933. — *G. B. Reed* u. *C. M. Spence*, Contrib. Canad. Biol. and Fisheries, N. S. 4, Nr. 19, 1923. — *F. Schönberg* u. *S. Debelic*, Berliner Tierärztliche Wochenschrift 1933, Nr. 25. — *W. Schwartz*, Deutsche Fischerei-Rundschau 1934, H. 8. — *Derselbe*, Angew. Chem. **48**, 629, 1935. — *Derselbe*, Rundsch. Techn. Arbeit Nr. 23, 1936; Ber. des VII. Internat. Kältekongresses im Haag 1936, 1937. — *W. Schwartz* u. *W. Bender*, Centralbl. f. Bakt. II. **95**, 33, 1936 — *J. M. Shewan*, Rep. of the Food Invest. Board **1935** (1936), S. 82. — *Mary M. Stewart*, J. Marine Biol. Assoc. of United Kingd. **18**, 35, 1932. — *Dieselbe*, Rep. of the Food Invest. Board **1931** (1932), S. **207**. — *S. A. Waksman, H. W. Reuszer, C. C. Carey, M. Hotchkiss* u. *C. E. Renn*, Biol. Bull. **64**, 183, 1933. — *C. E. Zobell* u. *D. Q. Anderson*, Bull. Am. Ass. Petroleum Geologists **20**, 258, 1936.

(De l'Institut botanique de l'Université, Bern.)

Recherches sur l'action des produits animaux sur le développement d'un microorganisme (Phycomyces). L'action du lait.

Par

W. H. Schopfer.

Avec 5 figures dans le texte.

(Eingegangen am 29. April 1937.)

Quoique *Phycomyces* ne se trouve qu'exceptionnellement en contact naturel avec des substances d'origine animale, il est tout de même intéressant de rechercher si les organes animaux ou leurs extraits sont capables d'activer le développement de ce microorganisme, dont la croissance, on le sait, est conditionnée par une ou plusieurs substances auxogènes.

Des recherches préliminaires ont déjà montré que c'était effectivement le cas [*Schopfer*, 1936 (10)] et l'on sait que les facteurs accessoires de la croissance des *levures* (avant tout bios II) sont également présents dans les tissus animaux. [*Nielsen* et *Hjorth-Hansen* (5), *Kögl* et *van Hasselt* (3), *Van Hasselt* (13).] Par le fait de l'action certaine de la vitamine B 1 pure, cristallisée, sur *Phycomyces* — qui en constitue le test le plus sensible connu — nous sommes autorisés à admettre l'intervention possible de toute substance contenant le facteur antinévritique, quelle que soit son origine. On sait que seules les plantes sont capables de faire la synthèse du facteur B 1, qui semble indépendante de l'activité chlorophyllienne (*champignons*, *bactéries*, *levures* contiennent de l'aneurine); nous avons d'autre part montré qu'un grand nombre d'extraits végétaux, fournis par des espèces très diverses, sont capables d'activer le milieu de culture de *Phycomyces* [*Schopfer* (9)]. Mais, le facteur B 1 est également contenu en quantité variable dans un grand nombre de tissus animaux; son existence est à rapporter à l'alimentation végétale des animaux.

Randoin et *Simonnet* (6) signalent le facteur B 1 dans la viande grasse et maigre, dans le foie, la cervelle, le jaune d'oeuf, le lait frais (il manque dans la crême et le beurre frais et le fromage gras). Il est également présent dans la poudre de lait dégraissée et le lait sucré condensé; sa thermostabilité relative fait qu'il ne disparait pas complètement dans les aliments animaux ayant subi l'action de la cuisson. Il est également présent chez certains animaux vertébrés et invertébrés étudiés parce qu'utilisés pour l'alimentation: hareng, huître, sardine etc. — Il est fort probable qu'on le retrouvera également dans d'autres tissus et d'autres animaux, moins étudiés par le fait qu'ils n'interviennent pas dans l'alimentation humaine. Dans sa monographie, *Ethel Browning* (2), qui réunit les diverses données connues jusqu'à ce jour, donne son existence comme certaine dans: le muscle de boeuf (*Grijns*, 1901; *Cooper*, 1912—14; *Osborne* et *Mendel*, 1917; *Hoagland*, 1929), dans le cerveau (*Cooper*, 1912—14; *Osborne* et *Mendel*, 1918), dans la caséine (*Randoin* et *Simonnet*, 1927; *Chick* et *Roscoe*, 1927), dans le jaune d'oeuf (*Mac Collum*

et *Davis*, 1915, *Chick* et *Hume*, 1917; *Tso*, 1926), dans le cerveau (*Cooper*, 1912—1914, *Osborne* et *Mendel*, 1918,) dans le foie (*Osborne* et *Mendel*, 1918). Dans le lait, le facteur B 1 est signalé par un grand nombre d'auteurs [*Browning* (2), p. 358—363]: lait humain et de divers animaux, lait frais, condensé, évaporé, poudre de lait. Sans que cet aliment soit particulièrement riche en vitamine antinévritique — on admet que la dose d'aneurine présente est juste suffisante — il a joué tout de même un rôle important dans le développement de la vitaminologie, comme point de départ de la théorie générale des vitamines (*Lunin*, 1881, *Hopkins*, 1912, *Funk*, 1913, *Osborne* et *Mendel*, 1911—12).

Bomskow (1) donne quelques chiffres précis, exprimés en unités de croissance-rat, par gramme de lait: lait de vache 0,1—0,15; lait de chèvre 0,1; lait de femme 0,05; jaune d'oeuf 0,5—1; viande de veau 0,25; foie de veau 1—1,6.

Une unité de croissance-rat équivaut à 1—2 unités internationales (U. I.), cette dernière correspondant à 2 γ de vitamine pure (2 à 3 selon des déterminations récentes).

Les quantités sont faibles; cependant étant donné la très forte sensibilité de *Phycomyces* (une unité *Phycomyces* = 0,005 γ), on peut s'attendre encore à une réaction nette, si dans la culture se trouve un fragment de tissu, dont le poids est inférieur à 1 g et si la vitamine B 1 s'y trouve sous une forme telle qu'elle puisse exercer son activité.

Action de divers organes et de leurs extraits.

En étudiant les réactions de *Phycomyces* sur des substrats contenant divers produits animaux frais, un fragment de ce dernier étant stérilisé avec le milieu[1], nous avons effectivement un déclanchement de la croissance attestant la présence de facteurs de croissance (10). Les tissus étudiés proviennent, dans un premier essai, du lapin. Le poids des récoltes obtenues dépasse souvent celui des cultures livrées par la quantité optimale de vitamine, en présence de 1 ‰ d'asparagine.

Le milieu de culture contient 5 % de glucose et 1 ‰ d'asparagine. Des fragments de tissu d'un poids croissant sont ajoutés à celui-ci. Avec le foie, les cultures passent de 16 à 147 mg, avec le poumon de 21 à 119 mg, avec le pancréas de 10 à 79 mg, avec les glandes salivaires de 21 à 103 mg, avec le rein, les récoltes atteignent 156 mg.

La question se pose de savoir si le fragment de tissu n'agit que par les facteurs de croissance qu'il recèle, ou s'il contribue à améliorer la nutrition azotée; cette dernière possibilité n'est pas exclue, mais comme *Phycomyces* ne se développe pas sans facteurs de croissance, force nous est d'admettre l'existence de ces derniers dans l'organe animal, leur diffusion dans le milieu de culture, et leur action prépondérante sur le microorganisme.

---

[1] Milieu habituel: glucose pur. 5 %, asparagine 1 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰, KH_2PO_4 1,5 ‰. *Erlenmeyers* de 150 ccm (Jena), avec 25 ccm de solution par culture.

En hâchant le foie en pulpe fine et en ajoutant 2 g de celle-ci à 100 ccm d'eau, nous obtenons une suspension opalescente; après décantation, cette dernière est adjointe à 25 ccm de notre milieu de culture inactif. Les résultats obtenus sont les suivants (tableau 1):

Tableau I.

extrait ccm	0	$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^3/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	4	8
récolte mg	6	9	8	12	18	27	54	70	90

La progression est nette et régulière et l'on voit qu'à partir de $^1/_{10}$ de ccm, l'action est parfaitement visible; cette dose de suspension contient les facteurs de croissance fournis par 2 mg de foie.

Il peut à première vue paraître osé d'attribuer l'action du tissu à la vitamine B 1 qu'il peut contenir; effectivement, nous ignorons sous quelle forme, le facteur antinévritique y est présent, libre ou adsorbé et si, en définitive, il est en état d'exercer son action, après la coagulation des protéides présents dans l'extrait. En nous basant sur les données admises, quant à la teneur du foie en facteur antinévritique (test animal), un calcul approximatif peut nous indiquer si l'action observée sur *Phycomyces* peut être rapportée à la présence de la vitamine.

Teneur en vitamine admise du foie: 1 -1,6 unités-croissance-rat. Pour simplifier le calcul, nous prenons comme base de calcul 1,5 unités. Une unité-rat correspond à 1- 2 U. I., soit 1,5. 1 g de foie contiendra donc 2,25 U. I. env.; une U. I. correspondant à 2- 3 γ de vitamine pure (soit 2,5 γ), la quantité de celle-ci contenue dans les 2 g de pulpe de foie suspendus dans 100 ccm d'eau est portée à 11,2 γ env.

La solution de vitamine pure utilisée habituellement contient 20 γ de vitamine pour 100 ccm (0,2 γ/ccm); le développement maximum est obtenu avec 0,5 γ soit 2,5 ccm de solution.

Avec notre suspension de foie, si nous admettons que la totalité du facteur B 1 qu'il contient a diffusé dans l'eau, on a 0,11 γ par ccm; avec 4 5 ccm on devrait obtenir le développement maximum; dans l'expérience précédente, le maximum de développement apparait avec 8 ccm; il est de 90 mg, chiffre normal.

On voit donc que sur la base de ce calcul purement théorique, on peut admettre l'action de la vitamine contenue dans le foie, et expliquer partiellement l'allure de la courbe obtenue.

Ces spéculations restent cependant problématiques: d'une part, la teneur du foie en vitamine B 1 est variable, et d'autre part, il n'est pas certain que toute la vitamine contenue ait diffusé et soit à la disposition du microorganisme. Malgré tout, elles nous montrent la possibilité de faire intervenir la vitamine B 1 du tissu animal dans la discussion des faits.

Les données quantitatives manquent, en ce qui concerne les autres tissus; il ne nous est pas possible d'interpréter numériquement les résultats de nos expériences, comme celà a été le cas pour le foie.

En utilisant la même méthode que pour l'extrait de germes de blé, il est possible de préparer à partir du foie un concentré très actif.

500 g de foie sont épuisés par l'alcool à 80°; après évaporation de celui-ci, précipitation par la baryte, neutralisation par l'acide sulfurique, précipitation de la vitamine B 2 par l'acétate de plomb, élimination de celui-ci par l'hydrogène sulfuré, et concentration, on obtient un extrait sirupeux (30 ccm) dont l'action est la suivante (Tableau II):

Tableau II.

extrait ccm	0	$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^3/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2
récolte mg	6	96	110	120	174	190	176

Avec $^5/_{100}$, l'effet est déjà extrèmement net et nous nous trouvons bien au-dessus de la limite d'action inférieure, ce qui donne une idée de la concentration de l'extrait en facteur de croissance. On pourrait admettre que les $^5/_{100}$ de ccm ne sont pas loin de contenir 0,5 γ de vitamine pure, ce qui porte à 10 γ la teneur du ccm (en exprimant la totalité de l'effet exercé par les facteurs de croissance en vitamine B 1).

Le poids inusité des récoltes, jusqu'à 190 mg, indique que d'autres facteurs doivent intervenir.

Une étude systématique des organes du rat nous conduit aux mêmes conclusions; les organes de cet animal sont prélevés immédiatement après sa mort; des petits fragments sont pesés sur la balance de précision, ajoutés immédiatement au milieu inactif et stérilisés avec lui.

On peut évidemment contester l'exactitude de la méthode et relever que par suite de la coagulation des albumines du tissu, la totalité des facteurs de croissance contenus dans les cellules ne diffusent pas forcément dans le milieu. A moins de procéder à une extraction prolongée des tissus par l'alcool, il n'y a pas d'autre méthode applicable. Comme on le voit par le tableau III, il semble bien y avoir une proportionnalité entre le poids du tissu et celui de la récolte, mais les courbes obtenues sont très irrégulières, ce qui peut à la rigueur s'expliquer par les anomalies de diffusion du facteur de croissance (tableau III).

Avec tous les organes utilisés, nous observons une activation du milieu; celle-ci est maximale avec le rein, le poumon et le cerveau.

La présence de vitamine étant admise dans un certain nombre d'organes — sur la base des données fournies par le test animal — nous pouvons logiquement invoquer son action pour expliquer les effets exercés sur *Phycomyces* par les tissus et leurs extraits. Avec les organes les plus actifs, nous observons l'établissement d'un plateau de la courbe.

Si nous nous rapportons aux résultats fournis par la vitamine pure, et si nous cherchons à exprimer en facteur B 1 la totalité de l'effet exercé par le tissu, nous arrivons à des chiffres que l'on peut considérer

Tableau III.

B 1 pure	0,01	0,02	0,06	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6 γ
récolte	8,5	12	24	39	65	87	85	82 mg

foie tissu	3	10	15	40	51	107 mg
récolte	17	40	48	84	93	94 „
coeur tissu	5	8	10	26	55	76 „
récolte	4	6	20	14	14,5	27 „
poumon tissu	1	3	7	11	14	52 „
récolte	22	29	33	60	90	93 „
rate tissu	2	4	13	30	34	52 „
récolte	—	18	21	31	36	50 „
rein tissu	5	6	10	15	29	53 „
récolte	15	22	43	72	79	95 „
muscle tissu	3	6	14	35	39	60 „
récolte	9	18	14	20	26	35 „
utérus tissu	3	10	12	23	54	110 „
récolte	9	12	14	16	23	34 „
cerveau tissu	6	9	9	30	32	79 „
récolte	14	16	14	34	39	75 „
cervelet tissu	1	47	85 mg			
récolte	5	54	75 „			
bulbe tissu	14	53 mg				
récolte	14	48 „				
sérum	0,5	1	2 ccm			
récolte	34	39	47 mg			
globules rouges		non pesés, 2 ccm env.				
récolte		77 mg				

Les fragments de graisse sont éliminés du morceau d'organe. Pour les tissus cérébraux, il n'est pas fait de différence entre matière grise et matière blanche. Le fragment de muscle provient d'un muscle abdominal.

comme admissibles. Si nous admettons le chiffre de 90 mg de récolte pour 0,5 γ de vitamine, nous trouvons pour le rein, le poumon 0,5 γ pour 50 mg, soit 10 γ par gramme, pour le foie 5 γ par gramme env.

Avec le sérum, nous avons trouvé une fois 39 mg de récolte avec 1 ccm (rat mâle) et une fois 69 mg pour 1 ccm (rat femelle): en comparant avec les données fournies par la vitamine pure, nous trouvons que 0,2 γ de cette dernière livre une récolte de 65 mg. La présence de 0,2 γ de vitamine B 1 par ccm de sérum est certainement possible et d'un ordre de grandeur acceptable. Mais nous le répétons, une telle expression des résultats n'est admissible qu'en vertu d'une convention selon laquelle toute l'activité du tissu est exprimée en vitamine B 1. Or nous savons que d'autres facteurs agissent également.

Action du lait.

Le lait est particulièrement intéressant à utiliser pour nos recherches; on ne se heurte pas à la difficulté de préparer un extrait, comme c'est le cas pour un tissu. La teneur en vitamine B 1 de ce liquide n'est pas aussi dépendante de celle du fourrage, comme on pourrait le croire; les bactéries de la panse des ruminants forment une quantité appréciable de facteur antinévritique, de telle sorte que le taux de ce dernier est relativement indépendant de la nutrition. Voir les données numériques, p. 232.

Nous utilisons pour nos expériences le lait de vache normal, écrémé, mais contenant encore une dose appréciable de matières grasses. Les désignations suivantes seront employées:

Lait complet n, n/2, n/4, 2 n: lait habituel écremé, concentration normale, dilué 2 et 4 fois, ou concentré 2 fois.

Petit lait n etc.: lait écremé ayant subi l'action de la présure; la caséine est éliminée; solution claire, jaunâtre. Les lactoglobulines et lactalbumines sont encore présentes.

Lait dégraissé: traitement prolongé par l'éther de pétrole; élimination de la majeure partie des matières grasses restantes et des pigments caroténoïdes.

Les échantillons en sont stérilisés avec le milieu habituel.

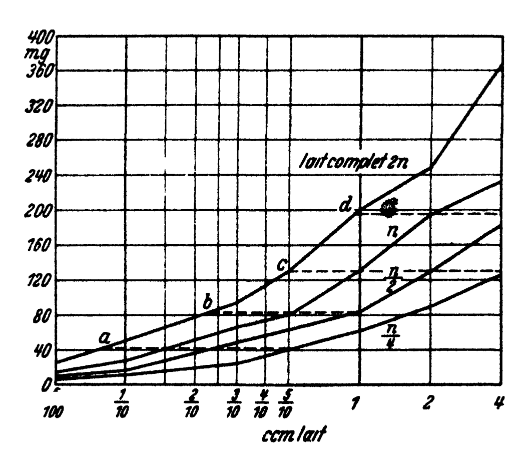


Fig 1. Action du lait à diverses concentrations.

On constate la forte activité du lait (voir fig. 1, p. 236), puisqu' avec $^{5}/_{100}$ de ccm, les cultures sont déjà bien développées et forment un thalle aérien. Les poids de culture atteints sont parmi les plus élevés que nous ayons obtenus. La sériation des courbes est remarquablement régulière: avec des laits dont les concentrations sont entre elles comme 2, 4 et 8, les volumes nécessaires pour produire le même poids de thalle sont, entre eux, exactement dans les mêmes proportions. (voir sur la figure les horizontales *a*, *b*, *c*, *d*).

Par le fait de la richesse du lait en azote assimilable, on pouvait s'attendre à ce que les courbes de croissance, dans les coordonnées habituelles ou logarithmiques, ne présentent pas de plateau. On sait que l'allure de la croissance est strictement liée à la teneur en azote du milieu, et que l'expression de l'action de la vitamine est conditionnée par cette concentration en azote [*Schopfer* (7)].

Avec une teneur en asparagine de 1 °/₀₀, le point anguleux et l'établissement du plateau se produisent avec 0,5 γ de vitamine pour 25 ccm de milieu; si la teneur en azote est plus élevée, la courbe continue sa marche ascendante, pour atteindre un maximum avec une dose beaucoup plus élevée de vitamine. Si la substance que nous ajoutons au milieu est riche en azote, avec les volumes élevés, de 2 à 8 ccm, la surcharge en azote assimilable est telle que le mécanisme décrit entre en jeu et que la courbe obtenue est complètement atypique dans sa partie supérieure (voir graphique fig. 2). C'est ce qui se produit pour le lait.

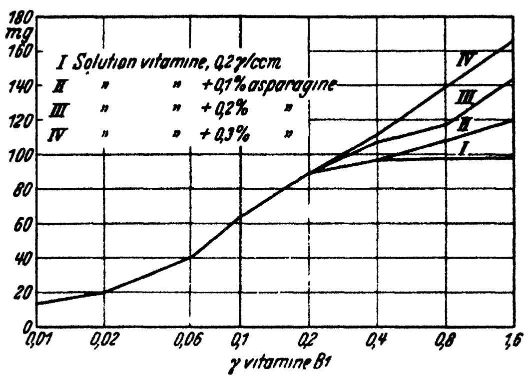


Fig. 2. Action de la vitamine pure, avec adjonction d'azote.

Le graphique est obtenu avec la solution habituelle de vitamine pure, à 0,2 γ/ccm, enrichie progressivement avec 1, 2 et 3 % d'asparagine. Le relèvement des courbes est net et l'effet obtenu se superpose bien avec celui que produit le lait. Il peut se manifester avec toute substance azotée assimilable. On peut donc affirmer déjà que le facteur de croissance nécessaire à *Phycomyces* se trouve dans le lait normal, mais que la richesse nutritive de cet aliment, particulièrement en ce qui concerne l'azote, modifie profondément l'allure de la croissance.

Action du petit-lait. Propriétés du facteur de croissance.

L'expérience qui suit a pour but de constater si l'élimination de la caséine exerce une influence de même que si, par un traitement spécial, il est possible de priver le lait de son action auxogène sur le microorganisme.

Les solutions suivantes sont utilisées: 1. lait normal; 2. petit-lait dégraissé; 3. petit-lait dégraissé, traité par l'acétate basique de plomb, ce dernier étant éliminé par H_2S; 4. même solution que 3, mais traitée par le noir animal (carbo medicinalis *Merck*). La solution 2 est obtenue par l'action de la présure en poudre; nous avons vérifié qu'à la dose employée, la présure n'exerçait aucune action visible sur *Phycomyces*. La solution 3 est obtenue par l'action répétée et prolongée de l'éther de pétrole, dans l'entonnoir à décantation. La solution 4 est préparée en faisant agir le noir animal sur un volume connu de lait; un court chauffage, suivi d'une filtration, fournit une solution claire qui est complétée au volume primitif. Le noir animal est complètement éliminé de la solution. Toutes ces préparations sont comparées à la courbe fournie par une solution de vitamine pure à 0,2 γ/ccm.

On constate que l'élimination de la caséine atténue l'effet auxogène de moitié environ (voir fig. 3, p. 238, point a). Il s'agit probablement d'une adsorption partielle du facteur de croissance, entrainé par le coagulum de caséine; il peut enfin s'agir d'une annulation de l'effet de l'azote supplémentaire. Le noir animal adsorbe complètement le facteur actif; ce dernier ne semble pas précipité par l'acétate de plomb. Ces caractères généraux sont ceux que nous avons maintes fois retrouvés chez les produits d'origine végétale, les concentrés de vitamine B 1; ce sont ceux de la vitamine B 1 pure.

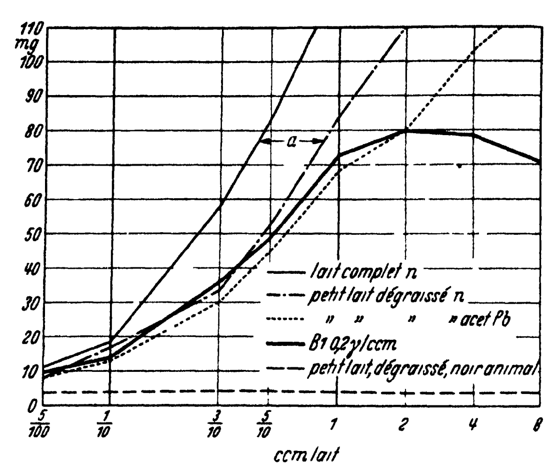


Fig 3. Action du petit lait apres divers traitements

Action de la chaleur sur l'effet auxogène du lait

Le petit-lait degraissé, à la concentration normale et dilué de moitié est soumis pendant 10 heures à la température de 127–130°. Il se produit un précipité qui est éliminé: le liquide est devenu brun, comme caramelisé.

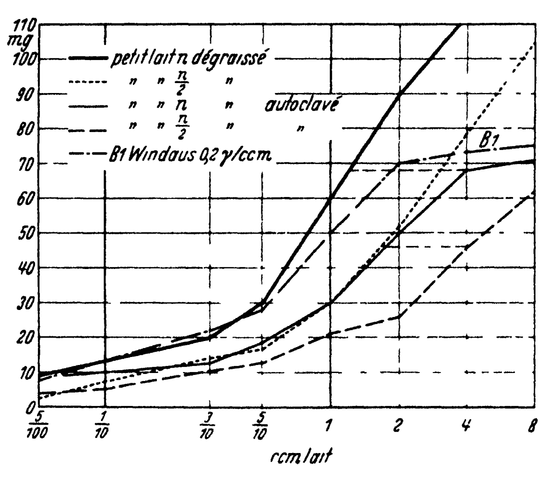


Fig 4 Action du petit-lait normal et autoclavé

On constate avec surprise que cette action prolongée de la chaleur bien qu'elle atténue l'action auxogène du lait, en laisse persister une notable partie, aussi bien dans le petit-lait normal que dans celui qui est dilué de moitié (fig. 4, p. 238). Dans les deux cas, petit-lait normal et dilué, l'autoclavage prolongé réduit l'action auxogène de 50 à 75%. Cette constatation ne manque pas d'intérêt et nous aidera à définir la nature possible du facteur de croissance.

Action du lait condensé.

Le lait condensé (Berner Alpenmilchgesellschaft Stalden) fut utilisé tel qu'il se présente au sortir de la boîte, puis dilué, de manière à ce qu'il corresponde au lait normal et au lait n/4.

Les résultats, portés sur la fig. 5, p. 239, sont nets: l'action auxogène n'est pas détruite par la condensation du lait, au moyen des méthodes habituelles. La courbe étonnante que l'on obtient avec le lait condensé pur — montée continue jusqu'à 504 mg — atteste une action auxogène correspondant à la forte concentration du liquide.

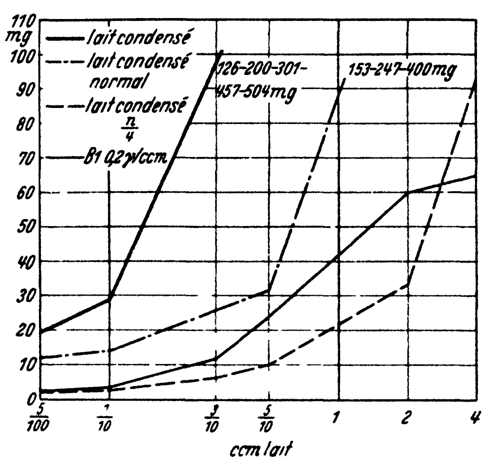


Fig. 5. Action du lait condensé à diverses concentrations.

Nature du facteur auxogène.

Les quelques caractères que nous avons mis en évidence: thermostabilité, solubilité dans l'eau, adsorption par le noir animal, non précipitation par l'acétate de plomb, quoique très généraux peuvent nous orienter. Remarquons tout d'abord que ce sont ceux présentés par tous les extraits végétaux actifs sur *Phycomyces*, par l'extrait de *levure*, et aussi par la vitamine B 1 pure, cristallisée. Connaissant l'activité de cette dernière sur notre microorganisme, nous pouvons — comme nous l'avons fait pour les extraits d'organes — baser la discussion sur l'action possible de la vitamine B 1 du lait.

Nous avons indiqué que, d'après de nombreux auteurs, elle y était présente et que l'écrémage ne diminuait pas sensiblement la valeur antinévritique du lait. D'après un certain nombre de données, elle est présente également dans le petit-lait, la fraction non liée aux protéides coagulés par la présure doit se retrouver dans le filtrat (petit-lait). D'après *Lecoq* (4), la vitamine B d'utilisation cellulaire, agissant sur la croissance des *levures* et correspondant par conséquent à un bios, serait adhérente à la caséine et manquerait totalement dans le petit-lait. Mais nous savons que le bios n'intervient pas dans nos cultures de *Phycomyces*; tout au moins n'est-il pas nécessaire de l'ajouter au milieu, le microorganisme, comme nous l'avons démontré, possédant la propriété de le synthétiser lorsque le milieu est activé par la vitamine B 1. Cette adsorption n'entre donc pas en ligne de compte dans la discussion.

Supplee, *Dow* et *Flanigan* (12) (cité d'après *Browning*) procèdent à la concentration du facteur antinévritique du lait et opèrent de la manière suivante: élimination de la crême, précipitation de la caséine, coagulation de la lactalbumine par la chaleur, cristallisation du phosphate de calcium et d'une grande partie du lactose; le liquide résiduel est concentré; le concentré est adjoint à un régime de base (rat) et atteste un forte activité antinévritique. — Il peut donc être considéré comme démontré que le petit-lait contient une quantité suffisante de facteur B 1. Qu'advient-il si nous faisons intervenir le critère de la thermostabilité? *Osborne* et *Mendel* [cité d'après *Randoin* et *Simonnet* (6)] constatent que le petit-lait désalbuminé, soumis à la chaleur humide (100^0) pendant 2 minutes ne perd pas ses propriétés curatives antinévritiques pour le rat. Une observation analogue est faite par *Mac Collum* et *Davis*: un chauffage de 1 heure à 120^0 à l'autoclave, n'exerce aucune action destructrice. Ces données sont établies à l'aide du test animal; si l'on se rappelle que, dans les conditions de culture appliquées ici, le microorganisme réagit déjà à la présence de $^1/_{100}$ d'unité internationale, et qu'avec $^1/_{10}$ d'unité de facteur B 1, les résultats sont déjà extrèmement nets, on peut admettre que le chauffage prolongé auquel nous nous sommes livré, n'empêchera pas le lait d'exercer une partie de son action auxogène sur le microorganisme. Nous avons effectivement observé qu'un chauffage très prolongé d'une solution de vitamine B 1 pure est nécessaire (4 – 6 heures à 120^0) pour que l'on observe une diminution d'activité nette sur *Phycomyces*.

Constatant la thermostabilité inusitée d'un grand nombre de produits et d'extraits quant à leur activité sur *Phycomyces*, nous avons été amené à admettre l'existence d'un second facteur de croissance, plus thermostable que la vitamine B 1, que nous avons appelé facteur *M*. Nous avons pu montrer [*Schopfer* et *Moser* (11)] qu'il existe un facteur *MR* agissant sur les espèces du genre *Rhizopus*, très thermostable et non adsorbable par le noir animal, et un facteur *MP*, agissant sur *Phycomyces*, thermostable également, mais fortement adsorbé par le noir animal. Avec la dénomination *MP*, nous définissons la totalité de l'action thermostable (plus qu'on ne l'admet habituellement pour la vitamine B 1) agissant encore sur *Phycomyces* après un autoclavage très prolongé des matériaux activants. On ne peut douter de l'existence de ce second facteur; de nombreuses recherches, effectuées en partie avec la collaboration du Dr. *A. Jung*, nous ont amené à la conclusion que le facteur *MP* pourrait bien n'être—dans certains cas—qu'un produit de décomposition thermique de la molécule de vitamine B 1 (peut-être l'un des deux constituants connus, base pyrimidique et thiazol correspondant).

En ce qui concerne le lait, nous pouvons ordonner nos arguments de la manière suivante: La vitamine B 1 est présente dans le petit-lait

et peut intervenir pour expliquer son action sur *Phycomyces*. Malgré l'action prolongée de la chaleur humide, on peut admettre qu'il en reste encore une dose suffisante pour activer le développement de *Phycomyces*. Si tel n'est pas le cas, il faut faire intervenir le facteur *MP* qui ne serait peut-être qu'un produit de décomposition de la vitamine B 1.

Interprétation numérique de nos résultats.

Nous pouvons la tenter—en faisant toutes les réserves désirables—sur la base des données admises (voir p. 232). Le lait de vache contiendrait 0,1 à 0,15 unités de croissance-rat par g. La valeur de l'unité de croissance-rat étant de 1—2 unités internationales et cette dernière correspondant à 2—3 γ de vitamine pure, on peut donc admettre, *comme moyenne*, la présence de 0,46 γ de vitamine pure par g de lait. En interprétant nos résultats sur cette base et en négligeant la densité du lait (de 1,029 à 1,033), nous remarquons que le ccm de lait normal, que nous ajoutons à notre milieu de culture, contient plus de deux fois plus de vitamine qu'il n'est nécessaire pour obtenir la courbe correspondant à la vitamine pure, qui sert de base de comparaison (0,2 γ/ccm); c'est en effet la solution à 0,2 γ ccm qui fournit, dans tous nos graphiques, la courbe standard. En considérant le graphique et en essayant d'exprimer la totalité de l'action auxogène du petit-lait en vitamine B 1 — par convention —, nous relevons que la courbe vitamine B 1 pure, correspond assez bien à celle livrée par le petit-lait normal. L'expérience nous a montré que ce genre de comparaison était valable et possible (en négligeant la partie supérieure de la courbe faussée par l'élévation du taux azoté de la culture): dans ce cas, nous pourrions dire que le petit-lait contient 0,2 γ de vitamine pure par ccm, ce qui est parfaitement admissible, cet ordre de grandeur correspond à celui des taux fournis par le test animal.

Nous n'affirmons nullement que seule la vitamine B 1 contenue dans le lait intervienne dans la physiologie du développement de *Phycomyces* et n'entendons pas éliminer la possibilité d'un facteur différent de l'aneurine (molécule entière). Il faut reconnaître également que les excellents résultats obtenus avec les cultures de *Phycomyces* découlent également de la richesse nutritive du lait et de l'équilibre biologique de ses divers constituants.

Le développement de *Phycomyces* est déclanché par le facteur de croissance, et très favorablement influencé par les aliments ordinaires du lait. Cette conclusion résume les deux actions en présence: action plastique des éléments banaux et catalytique du facteur de croissance.

Nous devons encore insister sur le fait que la comparaison des résultats fournis par *Phycomyces* avec ceux livrés par le test animal ne peut être absolument probante: elle ne le devient que lorsque les com-

paraisons sont faites sur la base du même échantillon de lait, selon la méthode que nous appliquons avec d'autres produits et concentrés riches en vitamine B 1. Il n'est pas impossible que notre test nous permette d'apprécier approximativement la teneur en vitamine B 1 du lait. L'interprétation des résultats dépend de la possibilité de l'existence du second facteur, de sa nature, de ses relations chimiques avec la vitamine B 1.

De toute façon, il est possible, avec une très petite quantité de lait ajoutée au milieu synthétique, de préparer un substrat nutritif excellent pour les *Mucorinées* qui exigent un facteur auxogène (auxo-hétérotrophes).

Conclusions.

Les tissus animaux (lapin, rat) et leurs extraits sont capables d'activer le développement de *Phycomyces* en milieu synthétique. Ils doivent contenir les facteurs de croissance nécessaires à ce microorganisme.

Ceux-ci sont présents également dans les extraits concentrés de foie. Il est possible—le calcul le montre—d'admettre l'intervention de la vitamine B 1 contenue dans ces organes, selon les données admises.

Le lait normal exerce sur *Phycomyces* une forte action auxogène. L'allure particulière de la courbe de croissance et le fort développement du microorganisme s'expliquent par la richesse du lait en matières azotées. L'action primaire: déclanchement de la croissance est due au facteur de croissance et l'action secondaire: exagération du développement—par rapport aux milieux synthétiques les plus complets—s'explique par la richesse nutritive du lait.

Le facteur présent est fortement thermostable, soluble dans l'eau, non précipitable par l'acétate de plomb, fortement adsorbable par le noir animal.

L'élimination de la majeure partie des matières azotées (caséine) ne diminue que faiblement l'activité auxogène du lait: le facteur de croissance ne semble que faiblement adsorbé par le coagulum. L'élimination des matières grasses ne nuit pas sensiblement à l'action du facteur auxogène.

L'existence de la vitamine B 1 dans le lait et le petit-lait étant admise, il est possible d'expliquer par elle l'effet du lait sur *Phycomyces*.

Si l'on exprime la totalité des facteurs de croissance agissant sur *Phycomyces* en vitamine B 1 par comparaison avec une courbe standard (vitamine pure), on arrive à des taux voisins de 0,2 γ par ccm, ce qui semble normal.

La présence et l'action d'un second facteur, plus thermostable que la vitamine B 1 est réservée, de même que sa relation possible avec le facteur antinévritique (produit de désintégration de cette dernière).

Il semble possible, dans certains cas favorables, de se servir de *Phycomyces* pour déterminer la teneur en vitamine B 1 du lait.

Travaux cités.

1) *C. Bomskov*, Methodik der Vitaminforschung. Leipzig, Thieme, 1935. — 2) *E. Browning*, The Vitamins, Monographs of the Pickett-Thompson Research Laboratory, Volume I, 1931. Baillière, Tindall & Cox, London. — 3) *F. Kögl* u. *W. Van Hasselt*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **248**, 189, 1936. — 4) *R. Lecoq*, Le lait envisagé comme aliment complet et biologiquement équilibré. Paris, Vigot, 1931. — 5) *N. Nielsen* u. *Sverre Hjorth-Hansen*, C. r. travaux Lab. Carlsberg, série physiol., **21**, No. 11, 1936. — 6) *L. Randoin* et *H. Simonnet*, Les données et inconnues du problème alimentaire. II. La question des vitamines. Les Presses universitaires de France, 1927. — 7) *W. H. Schopfer*, Arch. f. Mikrobiol. **6**, 510, 1935. — 8) *Idem*, Arch. f. Mikrobiol. **6**, 290, 1935. — 9) *Idem*, Arch. f. Mikrobiol. **7**, 156, 1936. — 10) *Idem*, C. R. Acad. Sciences, Paris **202**, 236, 1936. — 11) *W. H. Schopfer* et *W. Moser*, Protoplasma **24**, 538, 1936. — 12) *G. C. Supplee, O. D. Dow* et *G. E. Flanigan*, J. Dairy Sc. **11**, 420, 1928. — 13) *W. Van Hasselt*, Onderzoekingen over het Bios-Vraagstuk, Dissert. Utrecht 1935. — Les travaux non cités dans la bibliographie le sont d'après *Bomskov*, *Randoin* et *Simonnet* et *Browning*.

(De l'Institut botanique de l'Université, Bern.)

La ouate comme source de facteur de croissance de microorganisme.

Par

W. H. Schopfer et W. Rytz jr.

Avec 1 figure dans le texte.

(Eingegangen am 29. April 1937.)

Dans les laboratoires de microbiologie, la ouate brute, brune, non blanchie est d'usage courant pour la préparation des milieux stérilisés. Elle est préférée à la ouate blanche par le fait que les filaments possèdent encore leur mince couche de cire, ce qui empêche le mouillage du bouchon.

Dès le début de nos recherches sur les facteurs de croissance de microorganisme, nous avons utilisé exclusivement la ouate blanche, purifiée, afin de supprimer toute cause d'erreur possible. Il a été vérifié qu'une décoction d'ouate de cette qualité n'exerce aucun effet auxogène sur *Phycomyces*. Accidentellement, un tampon d'ouate brute étant entré en contact prolongé avec le milieu de culture inactif, nous observons un développement inusité du champignon. Il semble donc que la ouate libère dans le milieu quelque substance auxogène.

On pourrait se demander si les filaments d'ouate n'agissent pas par voie physico-chimique, en adsorbant à partir du milieu quelque substance à action oligodynamique, paralysant le développement du microorganisme. Le fait qu'il n'est pas nécessaire d'adjoindre au milieu les fragments d'ouate eux-mêmes, mais simplement une décoction préparée séparément, permet d'éliminer cette hypothèse: il doit s'agir vraiment d'une substance contenue dans les filaments et diffusant dans le milieu.

Une décoction d'ouate brute est préparée en mettant cette dernière avec de l'eau distillée, à l'autoclave, pendant 1 heure à 120°. Le liquide est alors extrait par pression; il est nettement jaune; la réaction de *Fehling-Cammidgs*, ainsi que celle de la ninhydrine sont positives; il y donc eu diffusion de sucre et d'azote solubles. L'acétate de plomb produit un trouble et un léger précipité.

Aucune de ces observations ne peut être faite avec une décoction de ouate blanche, pure.

Une série d'expériences est alors préparée avec diverses décoctions.

1. Ouate brute stérilisée pendant 1 h. à 120°. La décoction obtenue sert de liquide de base, dans lequel sont adjoints les constituants solides habituels.

2. La même opération est faite avec la ouate blanche.

3. Une décoction de ouate est ajoutée en quantités croissantes à un milieu habituel inactif.

4. La solution 1 est traitée au noir animal (carbo medicinalis de *Merck*), filtrée et complétée au volume primitif. Elle sert de liquide de base.

5. 2 g d'ouate brute sont calcinés; cendres dissoutes dans 5 ccm HCl n et neutralisées par NaOH n. Adjonction au milieu inactif en quantité croissante.

6. 25 g d'ouate brute sont, pendant 24 h, extraits par le chloroforme (*Soxhlet*); la solution est nettement jaune. Une quantité définie de celle-ci est versée dans les *Erlenmeyers* secs; le chloroforme est évaporé et le milieu normal inactif est ajouté.

7. Milieu de culture normal, inactif, stérilisé avec 2,5 g d'ouate brute; cette dernière est ensuite extraite.

8. Même opération avec 2,5 g d'ouate brute ayant au préalable subi un traitement prolongé à l'eau bouillante.

9. Même opération avec 2,5 g d'ouate blanche.

10. Même opération avec 2,5 g d'ouate blanche traitée au préalable avec l'eau bouillante.

11. Même opération avec 2,5 g d'ouate brute ayant subi le traitement au chloroforme (exp. 6).

12. La décoction de ouate est autoclavée pendant 4 heures à 120°. Elle sert de solution de base.

13. La même décoction est ajoutée en quantité croissante au milieu inactif.

14. La décoction d'ouate est traitée par la soude n/10, pendant 4 heures à 120°. Neutralisation par HCl. Elle sert de solution de base.

15. La même décoction est ajoutée en quantité croissante au milieu inactif.

Les cultures sont faites sur le milieu habituel (glucose 5 %, asparagine 1 ‰, sulfate de magnésie 0,5 ‰, phosphate acide de potassium, 1,5 ‰), à la température de 23° C. 25 ccm de milieu par *Erlenmeyer* de 150 ccm de volume.

Résultats obtenus.

Les poids secs sont donnés en mg. Le signe +, ++, +++ indique le degré de développement du mycelium aérien (voir Fig. 1. p. 246)

1. 64, 58, 60,5 +++ moyenne: **60,8** mg
2. 3, 3, 3,5, 3 moyenne: **3,1** mg

3.	avec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 ccm
		12	18	14,5	16	18	17,5	19,5	22,5	26	29 mg

4. 0, 2, 1 moyenne: **1** mg

5.	avec	1	2	3	4	5	6	6 ccm
		0	1	0	1	0	1	1 mg

6.	avec	1	2	3 ccm
		12	22,5	23,5 mg

7. 32, 36 + : moyenne: **34** mg
8. 21, 16,5 17 + moyenne **18,2** mg
9. 1,2 moyenne: **1,5** mg

10. 2, 0,5 moyenne: **1,25** mg
11. 33, 30, 38,5 ++ moyenne: **33,8** mg
12. 23, 23 ++ moyenne: **23** mg
13. avec 4 8 12 ccm: 10,5, 16, 21,5 mg.
14. }
15. } faible développement du thalle submergé, quelques mg
16. Contrôle, sans adjonction: 1, 1, 0, 0, 0 mg
17. Avec 0,5 γ de vitamine B 1 par culture de 25 ccm: 80 mg en moyenne.

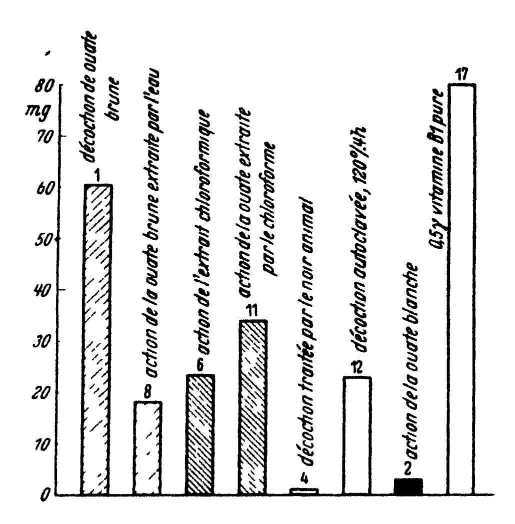


Fig. 1. Action de diverses préparations de ouate et de décoctions sur Phycomyces

Le sens de ces expériences est parfaitement clair. Il se résume en quelques mots:

1. Une substance auxogène doit être contenue dans les filaments de ouate brute. Il diffuse dans le milieu sous l'influence de la stérilisation.

2. Cette substance est thermostable, mais semble détruite par la cuisson alcaline. L'action prolongée de la chaleur (4 h, 120°) ne détruit qu'une partie de l'action auxogène.

3. La substance est complètement adsorbable par le noir animal utilisé.

4. Les cendres de ouate, reprises par l'acide chlorhydrique, sont sans action aucune.

5. L'action prolongée de l'ébullition, lors de la préparation d'une décoction, ne permet pas d'extraire toute la substance auxogène, la ouate ainsi traitée garde une certaine activité.

6. Le chloroforme (*Soxhlet*) semble entrainer avec lui une substance fonctionnant comme facteur de croissance. La ouate ainsi traitée,

ajoutée à un milieu inactif, ne permet pas d'obtenir la totalité de l'effet exercé par la ouate non traitée.

7. La ouate blanche est totalement inactive.

La série 6 semble indiquer que l'extrait chloroformique agit plus activement que l'extrait aqueux, série 3 (comparer l'action exercée par 3 ccm de chaque solution). En réalité, il n'en est rien, car la quantité de ouate traitée par le chloroforme, était beaucoup plus élevée que celle extraite par l'eau, et, d'autre part, l'extrait chloroformique était fortement concentré par ébullition sous basse pression.

Avons-nous affaire à deux facteurs, l'un soluble dans le chloroforme, l'autre dans l'eau ? Il n'est pas possible de donner une réponse précise à cette question. A maintes reprises, et avec des matériaux divers, s'est manifestée cette double solubilité, qui semblait confirmer notre hypothèse de la dualité des facteurs de croissance agissant sur *Phycomyces*, et donner un caractère positif à l'existence du facteur *M* (différent de la vitamine B 1). Ce problème, qui fait l'objet d'autres recherches, ne sera pas discuté ici.

Le fait de l'existence d'un facteur de croissance dans la ouate peut paraître singulier, il l'est moins si l'on se rappelle que sous l'influence de la cuisson, il diffuse dans le milieu des sucres réducteurs solubles. *Wehmer* (T II, p. 162 163) donne la composition complète des poils de graînes de coton. la matière sèche est constituée par 85 % de fibre brute, 10 % d'hydrates de carbone, 1,12 % de protéine, 0,61 % de lipides et 1,12 % de cendres (1)

Malgré les traitements subis par les poils pour les amener à l'état de ouate brute, on peut sans exagération admettre qu'une partie de ces substances s'y trouve encore. Nous pouvons rattacher nos observations à d'autres, de portée plus générale, qui ont déjà été faites, à savoir que le ou les facteurs activant le développement de *Phycomyces* se trouvent dans les organes (feuilles, tiges, racines, fleurs) d'un grand nombre d'espèces végétales. Il n'y a donc rien d'étonnant à ce qu'on les décèle aussi dans les poils du coton. Il faut relever que la quantité ne doit pas en être très grande, car plusieurs grammes de coton sont nécessaires pour activer 25 ccm de milieu de culture.

Quelle est la nature de ce facteur de croissance hydrosoluble, thermostable, adsorbable par le noir animal ? Il est difficile de la préciser. Ces caractères, très généraux, sont ceux de la vitamine B 1, dont nous savons l'action sur *Phycomyces* et dont nous connaissons la répartition étendue dans le règne végétal, à des doses qui suffisent pour notre microorganisme (2). Il peut paraître excessif de parler de vitamine de la ouate brute; on a tout au moins le droit de formuler l'hypothèse,

puisqu'elle cadre avec des faits connus, en remarquant que d'autres facteurs peuvent également être en cause[1].

Du point de vue pratique, une conclusion s'impose: c'est l'impossibilité d'utiliser cette qualité de ouate pour des recherches de ce genre. Même en admettant que la dose de substance active est faible, que le tampon d'ouate n'est pas fait pour être stérilisé avec le milieu, ce matériel est à exclure, dans toute expérience bien conduite.

Travaux cités.

1) *C. Wehmer,* Die Pflanzenstoffe, Fischer, Jena 1929, 2. Aufl. — 2) *W. H. Schopfer,* diese Zeitschr. 7, 156, 1936.

[1] Produits de désintégration de la vitamine B 1.

(Aus dem Botanischen Institut der kgl. ung. Josef-Universität für technische und Wirtschaftswissenschaften, Sopron, Ungarn.)

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur und des Wassergehaltes auf die Tätigkeit der Mikroorganismen des Bodens.

Von

D. Fehér und M. Frank.

Mit 16 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Mai 1937.)

Temperatur und Wassergehalt des Bodens sind die Naturfaktoren, die das Leben und das Wachstum der Mikroorganismen des Bodens mit ihrem komplexen Zusammenwirken grundlegend beeinflussen. Sie hängen in ihrer dynamischen Entwicklung derart eng zusammen, daß man ihre Rolle und ihren Einfluß nur dann richtig erfassen kann, wenn man sie als einen Faktorenkomplex auffaßt. Diese Erkenntnis hat *Fehér* dazu geführt, den biologischen Einfluß der beiden Faktoren derart auszudrücken, daß er durch Multiplikation ihrer numerischen Werte den Faktor „*R*“ bildet und diesen mit den quantitativen Änderungen der Mikroorganismen des Bodens in Zusammenhang bringt. Schon im Laufe der ersten diesbezuglichen, auf Grund von mehrjahrigen Freilandbeobachtungen durchgeführten Untersuchungen ist es gelungen, die gesamte Erscheinung in ihren Umrissen ziemlich deutlich und klar zu charakterisieren (1).

Im Laufe der bisherigen Arbeiten (2) wurde jedoch die Rolle und die Wirkung des Wassergehalts nur unzureichend ermittelt. Es erschien daher notwendig, das ganze Problem auf Grund der während der bereits durchgeführten Versuche gesammelten Erfahrungen nochmals eingehend zu prüfen und auch die bisher nur in großen Zügen ermittelten mathematisch-analytischen Grundlagen der ganzen Erscheinung exakt festzulegen. Bei der Anlage der jetzigen Versuche wurde die bei den ersten Untersuchungen verwendete Versuchsmethodik in vieler Hinsicht abgeändert. Besonderes Gewicht wurde darauf gelegt, beide Faktoren getrennt und in ihrem Zusammenwirken möglichst genau zu erfassen. An Stelle der mehr oder weniger zersplitterten kleineren Versuchsreihen haben wir hier eine einzige ausgedehnte und einheitliche Versuchsreihe angesetzt, wobei die beiden regulierenden Faktoren, Temperatur und Wassergehalt, regelmäßig durch eine entsprechende Versuchsmethodik in bekannten und konstanten Grenzen verändert und in ihrer gegenseitigen Wirkung konstant gehalten wurden. Wir waren diesmal

auch bestrebt, nicht nur das quantitative Verhalten der Bodenbakterien, sondern auch das der Bodenalgen und der Bodenpilze in die Untersuchungen einzubeziehen. Wir haben ferner nicht nur das Verhalten der einzelnen Mikroorganismengruppen, sondern auch die physikalischen und chemischen Faktoren berücksichtigt, deren Untersuchung uns bei der Lösung des vorliegenden Problems als notwendig erschien.

Methodik.

Die Versuchsreihe wurde folgendermaßen vorbereitet und behandelt. Die Bodenproben, im Gewicht von ungefähr 0,8 bis 1,0 kg, wurden in sterile Glaser, oben mit einem Wattebausch versehen, gefüllt. Durch den Wattebausch reichte ein Glasrohr bis in den Boden der Gefäße hinein, der mit einer Schicht von Kieselsteinen bedeckt war, um die Durchlüftung des Bodens und die Zuführung und gleichmäßige Verteilung der jeweiligen Wassergaben zu erleichtern. Die so vorbereiteten Gläser kamen nun in die Thermostaten, und zwar bei Temperaturgraden von 17, 21, 25, 30 und 35° C.

Der jeweilige Wassergehalt des Bodens betrug 2, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 %. Bei jedem Temperaturgrad wurde eine Kontrolle belassen, die der Austrocknung frei überlassen wurde. Die Konstanthaltung des Wassergehalts war natürlich bei der Durchführung dieser Versuche von ausschlaggebender Wichtigkeit. Sie wurde dadurch erreicht, daß die Gefaße jede Woche einmal abgewogen und durch sterilisiertes Wasser auf Gewichtskonstanz nachgefullt wurden. Die Wahl der angewendeten Temperaturen- und Feuchtigkeitsgrade war durch die Ergebnisse der bereits erwahnten ersten Untersuchungen begründet.

Es sei noch bemerkt, daß es mit Rücksicht darauf, daß auf Grund der bereits ermittelten Zusammenhänge die Wirkung des Faktorenkomplexes *R* bekannt war, nicht mehr notwendig war, die Temperaturgrade bis 0° abzustufen. Durch entsprechende Regulierung gelang es uns hinreichend, die wichtigsten Stufen der *R*-Werte darzustellen, die die spätere mathematische und analytische Behandlung des Untersuchungsmaterials ermoglichte. Als niedrigste Temperaturstufe konnte in den Thermostaten unseres unterirdischen Brutraumes die von 17° konstant gehalten werden.

Der Feuchtigkeitsgehalt der trockengelassenen Kontrollprobe betrug am Ende des Versuchs etwa 1 %, so daß als niedrigster *R*-Wert 17 ohne jede Schwierigkeit erreicht werden konnte. Wie die mathematische Behandlung gezeigt hat, hätte die Herstellung von niedrigeren *R*-Werten kaum einen praktischen Zweck gehabt.

Der Versuch wurde am 1. August 1934 angelegt und am 1. Juni 1936 abgebrochen. Die gesamte Versuchsdauer betrug also 22 Monate. Die im Juni 1936 vorgenommene Untersuchung erstreckte sich auf folgende Faktoren:

1. Die Gesamtzahl der Bakterien getrennt nach aeroben und anaeroben Bakterien, bestimmt mit der Plattenmethode. Die aeroben Bakterien wurden auf Agar- und Gelatineplatten, die anaeroben auf Dextroseagar in *Burri*-Rohren kultiviert, zur Bildung der Gesamtzahlen wurden diese drei Gruppen zusammengezählt.

2. Die Zahl der mikroskopischen Pilze, bestimmt auf Pilzagar.

3. Die verschiedenen physiologischen Bakteriengruppen, bestimmt mit der Verdünnungsmethode, und zwar die nitrifizierenden, die denitrifi-

zierenden, die stickstoffbindenden (aerob und anaerob), die cellulosezersetzenden Bakterien.

4. Die Zahl der Algen, ebenfalls mit der Verdünnungsmethode ermittelt.
5. Die p_H-Werte, bestimmt mit der Chinhydronelektrode.
6. Den Humusgehalt, bestimmt nach dem Kaliumbichromatverfahren.
7. Den Gesamtstickstoffgehalt, bestimmt mit der durch *Jodlbauer* modifizierten *Kjeldahl*-Methode.

Bezüglich der Einzelheiten verweisen wir auf die einschlägige Literatur (1).

Bei der Wahl der Untersuchungsmethodik waren wir uns der bekannten Unzulänglichkeiten der Plattenmethode natürlich bewußt, haben jedoch an ihr noch festgehalten, weil sie uns vorläufig für unsere Zwecke noch als die beste erschien; auch konnten so unsere jetzigen Ergebnisse mit den früheren verglichen werden.

Wie später noch gezeigt wird, spielt natürlich bei der Beurteilung des vorliegenden Fragenkomplexes die physikalische Struktur des Bodens eine recht bedeutende Rolle.

Zu dem Versuch wurde der Boden eines Eichenwaldes, ein Lehmboden, mit einer Wasserkapazität von 38* % verwendet. Dieser Boden wird vom Institut als Versuchsfläche 20/b ständig untersucht. Er ist gut mit Humus versorgt, so daß störende Einflüsse, die durch ein zu rasches Absinken des Humusgehaltes hätten hervorgerufen werden können, vermieden wurden. Die sonstigen Eigenschaften des Bodens wurden in den Tabellen bzw. Abbildungen jeweils angegeben. Da die Wasserkapazität bei der Bestimmung der optimalen Feuchtigkeitsgrenzen eine recht bedeutende Rolle spielt, so wollen wir noch besonders betonen, daß sich alle diesbezüglichen Daten auf den zur Verwendung gelangten Boden beziehen. Es entsprechen also die angewendeten Feuchtigkeitsgrade folgenden Wasserkapazitätsprozenten: Bodenfeuchtigkeit 1 % = 2,63 % Wasserkapazität, 2 % = 5,26 % Wk., 5 % = 13 % Wk., 8 % = 21 % Wk., 10 % = 26 % Wk., 15 % = 40 % Wk., 20 % = 52 % Wk., 25 % = 66 % Wk., 30 % = 79 % Wk., 35 % = 92 % Wk. Bei 40 % Feuchtigkeitsgehalt war der Boden gesättigt, und es stand oben natürlich noch eine dünne Schicht Wasser, um extreme Fälle auch untersuchen zu können. Auf die Rolle der Wasserkapazität werden wir auf Grund einiger Versuche weiter unten zurückkommen.

Besprechung der Untersuchungsergebnisse.

Die Ergebnisse der Untersuchungen haben wir in einer zusammenfassenden Tabelle (Tabelle I) zusammengestellt. Im folgenden besprechen wir nun die verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen getrennt in aller Kürze.

Die Bodenbakterien und Bodenpilze.

Die Ergebnisse sind, um die dynamische Natur der gesamten Erscheinung besser verstehen zu können, in der Abb. 1 übersichtlich dargestellt. Diese zeigt zunächst, daß bei dem verwendeten Boden das Optimum des Bakterienwachstums bei einer Temperatur von 25° C und bei 25 % Bodenfeuchtigkeit liegt. Die Optimumgrenze ist in beiden

* Ausgedrückt in Gewichtsprozenten.

Tabelle

	Bakteriengehalt je g feuchte Erde			Pilze je g feuchte Erde
	aerob	anaerob	zusammen	
17° C				
1% Wg.	1660000	200000	1860000	290000
2% „	2080000	400000	2480000	159000
5% „	2200000	800000	3000000	305000
8% „	2900000	300000	3200000	320000
10% „	2900000	500000	3400000	360000
15% „	3400000	600000	4000000	408000
20% „	3800000	600000	4400000	320000
25% „	3900000	700000	4600000	270000
30% „	2400000	600000	3000000	170000
35% „	2200000	500000	2700000	180000
40% „	2100000	500000	2600000	200000
21° C				
1% Wg.	2000000	400000	2400000	280000
2% „	1200000	1000000	2200000	130000
5% „	2080000	600000	2680000	380000
8% „	2400000	700000	3100000	540000
10% „	2900000	1200000	4100000	560000
15% „	4600000	600000	5200000	600000
20% „	5100000	900000	6000000	370000
25% „	6000000	500000	6500000	220000
30% „	2400000	800000	3200000	240000
35% „	2700000	700000	3400000	180000
40% „	2500000	400000	2900000	230000
25° C				
1% Wg.	2300000	200000	2500000	82000
2% „	2470000	500000	2970000	90000
5% „	2100000	300000	2400000	200000
8% „	2600000	400000	3000000	400000
10% „	3600000	350000	3950000	488000
15% „	6700000	500000	7300000	820000
20% „	7400000	600000	8000000	520000
25% „	10800000	400000	11200000	232000
30% „	6900000	700000	7600000	160000
35% „	6300000	650000	6950000	220000
40% „	6200000	600000	6800000	46000
30° C				
1% Wg.	980000	60000	1040000	180000
2% „	1500000	500000	2000000	89000
5% „	1600000	300000	1900000	280000
8% „	2000000	700000	2700000	490000
10% „	3600000	300000	3900000	540000
15% „	4700000	300000	5000000	560000
20% „	6000000	500000	6500000	320000
25% „	8000000	500000	8500000	326000
30% „	5000000	900000	5900000	140000
35% „	4000000	800000	4800000	103000
40% „	2200000	1000000	3200000	87000

I.

Bakterien: nitrifizierende je g feuchte Erde	Bakterien: denitrifizierende je g feuchte Erde	Bakterien: N-bindende je g feuchte Erde, aerob	Bakterien: N-bindende je g feuchte Erde, anaerob	Bakterien: Cellulosezersetzer je g feuchte Erde	p_H	Humusgehalt %	Gesamtstickstoff mg/100 g	Algen je g feuchte Erde	R.
10000	500000	100	0	100	4,61	2,60	150,0	80	17
10000	100000	1000	0	1000	4,40	2,56	162,4	20	34
50000	100000	1000	0	1000	3,70	2,48	173,6	20	85
50000	500000	100	0	1000	3,76	2,21	126,0	40	136
50000	2500000	1000	0	1000	3,90	2,06	137,20	320	170
75000	1750000	1000	0	5000	4,05	2,14	137,2	320	255
75000	3750000	100	0	5000	4,02	2,02	98,0	640	340
75000	1750000	1000	10	1000	4,16	1,98	126,0	1280	425
50000	2500000	100	10	1000	4,50	2,00	72,8	320	510
10000	1000000	100	10	500	4,60	2,15	117,6	320	595
10000	100000	100	0	1000	5,05	2,56	67,2	80	720
50000	100000	100	0	100	5,21	2,29	144,8	80	21
10000	1000000	100	0	1000	4,96	1,95	132,0	320	42
50000	1000000	1000	0	1000	5,15	2,40	109,2	320	105
50000	1000000	1000	0	1000	5,00	1,50	125,2	320	168
50000	2500000	100	0	5000	4,50	0,92	134,4	320	210
50000	1000000	1000	0	1000	4 80	0,95	117,6	320	315
75000	1750000	1000	10	1000	4,60	0,97	106,4	320	420
100000	1000000	10000	10	10000	5,30	0,70	112,0	640	525
100000	1000000	1000	100	10000	5,50	1,20	72,8	640	630
50000	100000	1000	100	1000	5.70	2,26	95,0	320	735
50000	100000	100	0	1000	5,94	2,58	56,0	320	840
50000	250000	10	10	10	4,80	2,41	130,40	320	25
50000	250000	10	10	100	4,20	2,40	152,40	320	50
100000	500000	100	10	100	3,89	2,91	143,6	1280	125
100000	750000	100	10	10	3,73	1,94	112,0	1280	200
250000	750000	1000	10	100	4 17	2,22	100,8	1280	250
250000	1750000	1000	10	1000	4,49	1,22	67,2	1280	375
250000	1000000	10000	10	5000	4,26	0,90	61,6	2560	500
175000	750000	10000	10	50000	5,01	1,04	64,40	2560	625
250000	1000000	1000	10	50000	5,79	1,00	64,40	1280	750
175000	1000000	100	10	10000	6,01	2,15	86 80	1280	875
100000	750000	10	100	1000	6,08	2,26	95,20	1280	1000
50000	50000	10	10	100	5,18	2,20	67,2	320	30
50000	100000	10	10	10	5,17	2,16	89,6	320	60
100000	50000	10	10	10	5,30	2,10	131,6	320	150
50000	1000000	10	10	100	5,21	2,10	128,8	1280	240
250000	1000000	10	10	100	5,14	1,83	103,6	640	300
250000	1000000	10	10	1000	4,61	0,88	100,8	640	450
250000	1000000	100	10	1000	4,74	0,79	109,2	1280	600
250000	1750000	100	10	10000	4,84	0,68	75,60	80	750
250000	1750000	100	10	10000	5,54	0,77	62,0	320	900
100000	500000	10	100	100	5,52	0,93	86,80	320	1050
100000	750000	10	100	100	6,34	1,40	75,60	80	1200

Tabelle

	Bakteriengehalt je g feuchte Erde			Pilze je g feuchte Erde
	aerob	anaerob	zusammen	
35° C				
1% Wg.	700000	100000	800000	86000
2% „	1500000	200000	1700000	120000
5% „	1500000	600000	2100000	155000
8% „	1800000	700000	2500000	400000
10% „	2700000	500000	3200000	490000
15% „	3550000	400000	3950000	510000
20% „	4400000	500000	4900000	320000
25% „	4800000	800000	5600000	200000
30% „	3100000	700000	3800000	190000
35% „	2800000	600000	3400000	170000
40% „	2500000	500000	3000000	100000
Anfangswerte:	5800000	1300000	7100000	550000

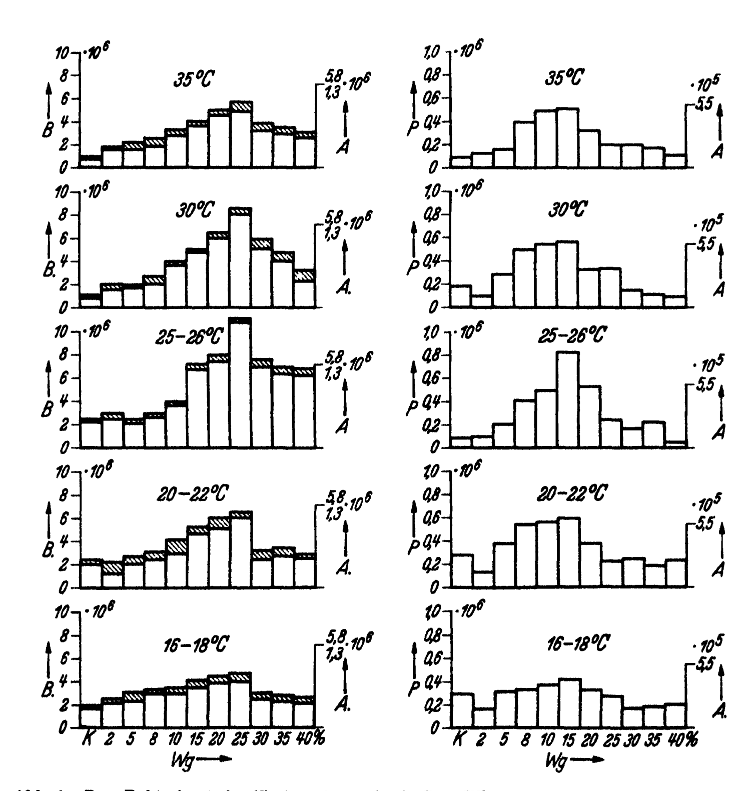


Abb. 1. *B* = Bakterien (schraffiert = Anaeroben); *P* = Pilze; *Wg* = Wassergehalt; *A* = Anfang; *K* = Kontrollprobe ohne Behandlung.

I (Fortsetzung).

Bakterien					p_H	Humusgehalt	Gesamtstickstoff	Algen je g feuchte Erde	R
nitrifizierende	denitrifizierende	N-bindende je g feuchte Erde		Cellulosezersetzer je g feuchte Erde					
je g feuchte Erde		aerob	anaerob			%	mg/100 g		
50000	500000	10	10	100	4,87	1,37	64,4	20	35
100000	750000	10	10	100	5,00	1,26	72,8	20	70
100000	1000000	10	10	100	4,36	1,06	75,6	20	175
100000	1000000	10	10	1000	4,16	1,00	50,4	20	280
100000	1000000	10	10	1000	4,11	1,12	61,6	20	350
100000	500000	10	100	1000	4,11	0,98	70,0	20	525
250000	1000000	100	100	1000	4,06	0,84	56,0	640	700
250000	1000000	100	100	5000	4,06	0,80	84,0	80	875
250000	2500000	10	10	10000	4,16	0,90	50,4	20	1050
50000	2500000	10	10	1000	4,55	1,20	56,0	20	1225
10000	1750000	10	10	100	4,89	1,40	53,2	20	1400
10000	100000	100000	100000	10000	5,21	2,26	54,32	640	

Richtungen scharf ausgeprägt. Da die Wasserkapazität des Versuchsbodens 38 % betrug, so entspricht die Lage des Feuchtigkeitsoptimums rund 66 % der Wasserkapazität.

Bei den Bodenpilzen finden wir das gleiche Temperaturoptimum. Die Grenze des Feuchtigkeitsoptimums ist jedoch etwas nach den kleineren Feuchtigkeitsbereichen verschoben. Sie liegt bei 15 % Wassergehalt, also bei 40 % der Wasserkapazität, was wahrscheinlich daher rührt, daß die Bodenpilze ausgeprägt aerob sind und infolgedessen einen höheren Wassergehalt des Bodens nicht vertragen können. Bemerkenswert ist, daß die jetzt ermittelten Temperaturgrenzen ganz dieselben sind, die *Fehér* schon bei seinen ersten diesbezüglichen Untersuchungen (2) festgestellt hat.

Der relative Anteil der anaeroben Bakterien nimmt nach dem Überschreiten der Optimumgrenzen sichtlich zu. Die Ursache davon dürfte darin zu suchen sein, daß die anaeroben Bakterien infolge ihrer Fähigkeit zur Sporenbildung extreme Temperaturen und Feuchtigkeitsgrade des Bodens besser vertragen können als die empfindlichen aeroben Bakterien, zu denen viele Formen gehören, die dieser Fähigkeit entbehren.

Die eben mitgeteilten Optimumbereiche betreffen die Gesamtmenge der Bodenbakterien. Wie wir später sehen werden, gibt es auch Bakteriengruppen, bei denen diese Grenzen etwas verschoben sind; dazu gehören die nitrifizierenden, denitrifizierenden und cellulosezersetzenden Bakterien. Da jedoch der verhältnismäßige Anteil dieser Bakterien im Verhältnis zur Gesamtzahl nicht erheblich ist, so entfaltet wenigstens

der überwiegende Teil der Bodenbakterien seine intensivste Lebensaktivität bei 25° C Bodentemperatur.

Die Temperaturgrenze stimmt ihrerseits gut mit den Sommertemperaturen in 20 bis 30 cm Bodentiefe überein, wo das intensivste Mikroorganismenleben stattfindet; in unseren Naturböden wird sie nur in den heißesten Sommermonaten und auch dann nur während kurzer, schnell vorübergehender Perioden erreicht oder überschritten. Auch der optimale Grad der Bodenfeuchtigkeit wird in diesen Tiefen nur vorübergehend erreicht. In beiden Fällen sehen wir also eine weitgehende Anpassung der Mikroorganismen.

Die Stickstoffbakterien und der Gesamtstickstoffgehalt.

Die Ergebnisse der Untersuchung über das Verhalten der nitrifizierenden, denitrifizierenden und stickstoffbindenden Bakterien zu-

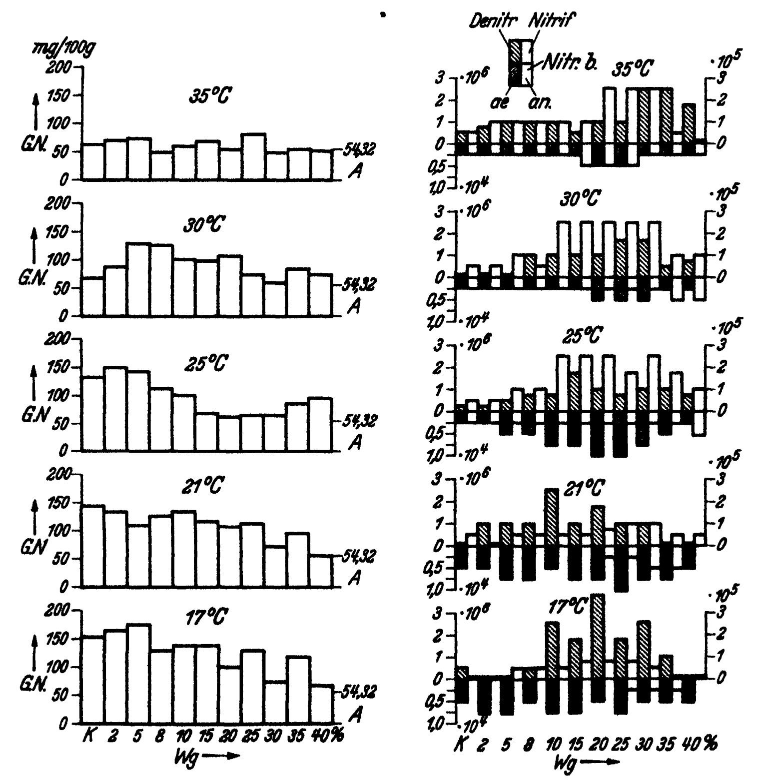


Abb. 2. *GN* = Gesamt-Stickstoffgehalt; *Nitr.* = nitrifizierende Bakterien; *Denitr.* = denitrifizierende Bakterien; *Nitr. b.* = stickstoffbindende Bakterien (*ae* = aerob, *an* = anaerob); *Wg* = Wassergehalt; *K* = Kontrollprobe; *A* = Anfang.

sammen mit den Veränderungen des Gesamtstickstoffgehaltes enthält Abb. 2. Die wichtige Gruppe der *nitrifizierenden Mikroorganismen*

erreicht ihre optimale Entwicklung zwischen 25° und 35° Bodentemperatur. Da wir bereits auf Grund der ersten Beobachtungen wußten, daß erst Temperaturen über 35° auf diese Mikroorganismen hemmend wirken (2), so haben wir unsere Untersuchungen nur bis zu dieser Temperaturgrenze ausgedehnt. Jedenfalls beweisen die Ergebnisse die wichtige Tatsache, daß es in unseren Naturböden nur in Ausnahmefällen zu einer optimalen Tätigkeit der nitrifizierenden Bakterien kommt. Aber auch bei verhältnismäßig niedriger Temperatur kann die Nitrifizierung sehr bedeutend sein. Die Grenzen der für die nitrifizierenden Bakterien optimalen Feuchtigkeit sind etwas weit gezogen. Im allgemeinen wird aber die optimale Entwicklung gewöhnlich zwischen 10 und 30 % Bodenfeuchtigkeit erreicht. Über 30 % Wassergehalt (rund 80 % der Wasserkapazität) beginnt bereits die hemmende Wirkung der Bodenfeuchtigkeit. Jenseits dieser Grenze können die streng aeroben nitrifizierenden Bakterien sich nicht mehr genügend mit Sauerstoff versorgen. Es wirken aber nicht nur die höchsten Feuchtigkeitsgrade, sondern auch die niedrigeren ausgesprochen hemmend. Besonders die Feuchtigkeitsgrade von 2 bis 8 % sind, wenigstens bei den niedrigen Temperaturen, deutlich begrenzend. Die optimale Entwicklung der nitrifizierenden Bakterien beginnt fast bei allen Temperaturen bei 10 % Feuchtigkeitsgehalt.

Der optimale Feuchtigkeitsbereich der *denitrifizierenden Bakterien* ist nicht einheitlich. Die Grenzen hängen von der jeweiligen Temperatur ab. Bei niedrigen Temperaturen beginnt das Optimum bereits bei 10 % Bodenfeuchtigkeit und wird bei 20 % abgeschlossen. Bei den höchsten angewendeten Temperaturen werden die Grenzen des Optimumbereiches nach 25 bis 35 % verschoben. Was die Wirkung der Temperatur angeht, so liegt die optimale Entwicklung dieser Bakterien bei den extremen Temperaturgrenzen. Wie schon von *Fehér* betont wurde, besteht zwischen der Entwicklung der nitrifizierenden und der denitrifizierenden Bakterien ein ausgesprochener Antagonismus (1). Auch kommt die Fähigkeit zu denitrifizieren eigentlich nur ganz wenigen Bakterien zu. Die sogenannten echten denitrifizierenden Bakterien sind gewöhnlich in ihrer Zahl beschränkt. Bei der angewandten Versuchsmethodik wird die sogenannte Nitratreduktion bestimmt, die ausgesprochen anaerober Natur ist und vornehmlich dort sich einstellt, wo die aeroben Bakterien ungünstige Lebensbedingungen finden.

Das eben geschilderte antagonistische Verhalten der beiden Gruppen bei den höchsten Wassergehalten und Temperaturen ist als Folge der dann herrschenden anaeroben Verhältnisse leicht zu verstehen, weniger leicht das Vorherrschen der Denitrifikation bei niedriger Temperatur. Vielleicht spielt Verdrängung der aeroben Bakterien durch anaerobe infolge der ungünstigen Lebensbedingungen eine Rolle.

Bei den *stickstoffbindenden Bakterien* liegt die optimale Temperatur und Feuchtigkeit bei 25° C bzw. 25%. Ihr Verhalten stimmt also mit dem der meisten Bakterien (vgl. S. 264) überein.

Über das Verhalten des *Gesamtstickstoffgehaltes* läßt sich noch nichts Endgültiges feststellen. Aus Abb. 3 geht hervor, daß beinahe bei allen Temperaturen der Gesamtstickstoffgehalt zugenommen hat. Nur bei den höchsten untersuchten Temperaturen und Feuchtigkeitsgraden, die über 25° C und 25 % liegen, ist diese Zunahme nicht mehr so deutlich. Hier dürfte vor allem nicht nur die unzureichende aerobe Stickstoff-

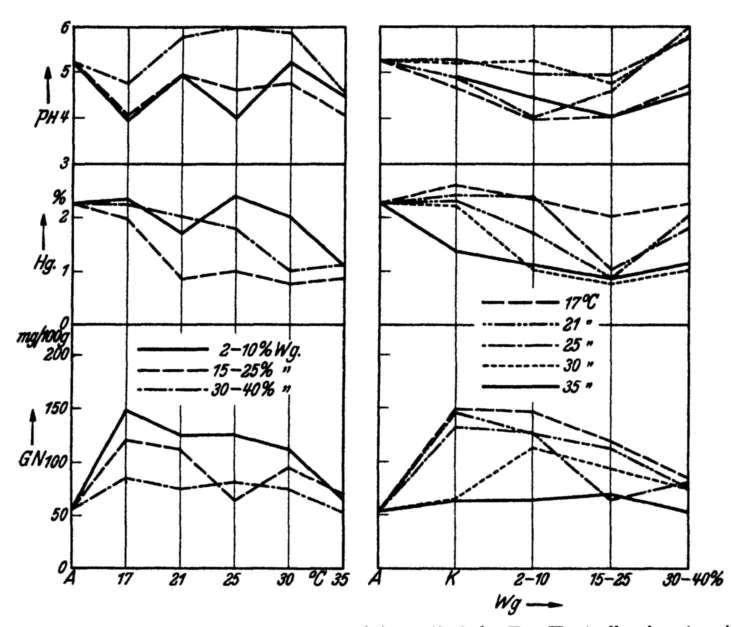


Abb. 3. *Hg* = Humusgehalt; *GN* = Gesamt-Stickstoffgehalt; *K* = Kontrollprobe; *A* = Anfang; *Wg* = Wassergehalt.

bindung, sondern auch die ziemlich intensive Denitrifikation eine Rolle spielen. Die Abnahme des Stickstoffgehaltes infolge der zunehmenden Denitrifikation beginnt bereits bei 10 % Feuchtigkeitsgehalt.

Die Wirkung der Stickstoffbindung läßt sich überall nachweisen. Allerdings darf man aus der rein quantitativen Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes noch keine endgültigen Schlüsse auf das Maß der Stickstoffbindung ableiten, spielt doch im Stickstoffhaushalt des Bodens die Denitrifikation immer eine Rolle, so daß die Deutung des gewonnenen Bildes unklar und zweifelhaft ist. Aus Abb. 3 können wir noch ableiten, daß der höchste Stickstoffgehalt sich bei 17° C und bei den niedrigsten Feuchtigkeitsgehalten einstellen wird. Die Fähigkeit der stickstoffbindenden Bakterien, sich auch bei den niedrigsten Temperaturen und

Feuchtigkeitsgraden noch recht günstig zu entwickeln, kommt in dem Verhalten des Gesamtstickstoffgehaltes deutlich zum Ausdruck. Den höchsten Stickstoffgehalt werden wir daher in jenen Proben vorfinden, die bei den niedrigsten Temperaturen und zwischen den niedrigsten Feuchtigkeitsgrenzen gehalten sind. Im übrigen hängt, wie vorher bereits betont ist, der Gesamtstickstoffgehalt von einer ganzen Reihe von Faktoren ab, die sich auch gegenseitig beeinflussen, und die bei unserer Versuchsanordnung noch nicht restlos erfaßt werden konnten, und so erscheint die Einleitung von weiteren Versuchen zur Klärung und Entscheidung notwendig.

Nach unseren Beobachtungen können wir auch in den Naturböden die stärkste Stickstoffbindung bei nicht zu hoher Bodentemperatur und bei nicht zu hoher Bodenfeuchtigkeit erwarten. Die aeroben Stickstoffbinder entwickeln sich ja hauptsächlich bei niedriger Temperatur und verlangen keine starke Bodenfeuchtigkeit. Die Entwicklung der anaeroben Stickstoffbinder beginnt erst bei 25 bis 30 % Bodenfeuchtigkeit. Von da an aufwärts können wir sie fast in allen Feuchtigkeitsbereichen beobachten. Ihre optimale Entwicklung liegt bei 35° C. Diese Feststellung erklärt die allgemeine Verbreitung der *Azotobakter*-Gruppe in unseren Naturböden, in denen ja gewöhnlich keine hohen Temperatur- und Feuchtigkeitsgrade herrschen, sofern keine Verschlechterung des Bodens eingetreten und die Sauerstoffzufuhr gesichert ist.

Die cellulosezersetzenden Bakterien.

Die cellulosezersetzenden Bakterien erreichen ihr Optimum ebenfalls bei 25° C Bodentemperatur. Die optimale Grenze der Bodenfeuchtigkeit liegt etwas höher, etwa bei 30 % (79 % der Wk.[1]). Nur bei der niedrigsten Temperatur von 17° C finden wir als Optimum fur die Cellulosezersetzung 15 bis 20 % Bodenfeuchtigkeit (s. Abb. 4, S. 260). Die cellulosezersetzenden Bakterien erreichen also ihre Optimalentwicklung bei 25° und bei 30 % Wassergehalt des Bodens. Da an der Cellulosezersetzung insbesondere die anaeroben Bakterien beteiligt sind, läßt sich der Einfluß des höheren Wassergehaltes leicht erklären. Man darf aber aus diesem Umstand keine weitgehenden Folgerungen für die mikrobiologischen Zersetzungsvorgänge in den Naturböden ableiten. Namentlich unter unseren Breitegraden wird das Optimum der Temperatur für diese Mikroorganismen und damit auch der höchste Grad der Cellulosezersetzung in unseren Böden nur selten erreicht. Da aber bei niedrigerer Temperatur das Optimum schon bei einer Bodenfeuchtigkeit von 15 bis 20 % erreicht wird, so werden in den Naturböden für die Tätigkeit dieser Bakteriengruppe bereits diese Feuchtigkeitsgrade ausreichen.

[1] Wasserkapazität.

In seiner ersten diesbezüglichen Arbeit hat *Fehér* (2) die Optimumgrenze der cellulosezersetzenden Bakterien bei 35 bis 40° C angegeben. Die jetzigen Untersuchungen haben etwas abweichende Ergebnisse geliefert. Nach ihnen wird der Optimumbereich schon bei 25° C begrenzt. Dieser Widerspruch ist aber nur scheinbar. Die höhere Grenze wurde seinerzeit auf Grund der Zersetzung der Humusstoffe angegeben, wobei die Bakterien selbst nicht gezählt worden sind. Man muß nämlich, wie das *Fehér* schon seinerzeit betont hat, zwischen der zahlenmäßigen Entwicklung der

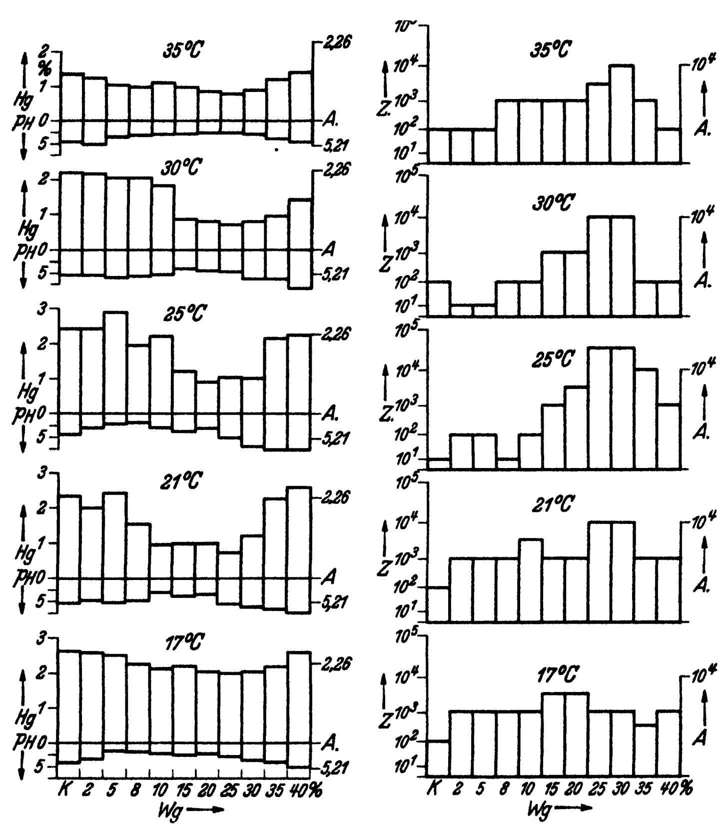


Abb. 4. *Hg* = Humusgehalt; *Z* = Zelluloseersetzende Mikroorganismen; *K* = Kontrollprobe; *A* = Anfang; *Wg* = Wassergehalt.

verschiedenen Mikroorganismen des Bodens und zwischen ihrer Tätigkeit unterscheiden. Bei der Cellulosezersetzung wirkt auch die Temperatur mit. Es ist daher möglich, daß bei einer geringeren Zahl der cellulosezersetzenden Bakterien bei höheren Temperaturen eine intensivere Tätigkeit stattfindet als bei einer höheren Zahl, die bei einer niedrigeren Temperatur wirkt. Wir dürfen auch nicht vergessen, daß bei der höheren Temperatur auch thermophile Cellulosezersetzer zur Geltung kommen. Alle diese Erscheinungen berühren aber nicht die Tatsache, daß die größte Zahl und die intensivste Tätigkeit der aeroben und anaeroben Cellulosezersetzer bei 30 % Wassergehalt und 25° Bodentemperatur erreicht wird.

Im Anschluß an die Besprechung des Verhaltens der cellulosezersetzenden Bakterien sei noch auf den ***Humusgehalt*** und auf die Änderungen der p_H-*Werte* an Hand der Abb. 3 und 4 eingegangen. Zunächst zeigt sich, daß der niedrigste Grad des Humusgehaltes immer mit der optimalen Entwicklung der Bodenbakterien und der Bodenpilze zusammenfällt. Stellt man diese Verhältnisse in einem Koordinatensystem dar, so bekommt man eine ausgesprochene Hyperbelfunktion (s. Abb. 5), auf die von uns bereits in den früheren Arbeiten des Institutes hingewiesen wurde (3). Zwischen den Änderungen des Humusgehaltes und der p_H-Werte sind ebenfalls gewisse Zusammenhänge festzustellen. Der Humusgehalt nimmt bei allen Feuchtigkeitsgraden und Temperaturen ab, aber natürlich nicht überall gleich stark. Der Minimalgehalt wird bei 35° C und 15% bis 25% Bodenfeuchtigkeit erreicht. Die p_H-Werte erreichen ein Maximum bei 25° C und bei 30 bis 40 % Bodenfeuchtigkeit. Ihre Maximalentwicklung stimmt also mit der optimalen Entwicklung der cellulosezersetzenden Bakterien überein. Die niedrigsten p_H-Werte sind bei 17 bis 25° C und bei 2 bis 10 % Bodenfeuchtigkeit zu beobachten. Im allgemeinen ist eine gewisse Gegenläufigkeit zwischen den p_H-Werten und den Werten des Humusgehaltes festzustellen. Diese Erscheinung wird besonders deutlich, wenn man in der Abb. 4 die Änderungen der p_H-Werte und des Humusgehaltes in den einzelnen Temperaturbereichen vergleichend betrachtet.

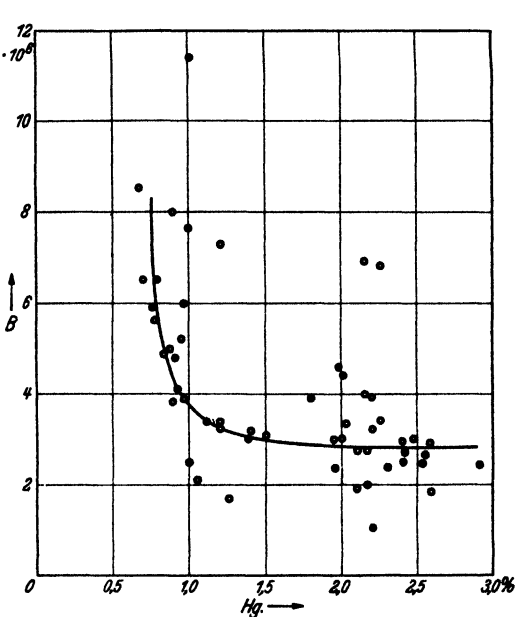


Abb. 5 Der quantitative Zusammenhang zwischen Bakterienzahl (*B*) und Humusgehalt (*Hg*)

Diese Beobachtungen dürften leicht verständlich sein, da dort, wo die sauren Nebenprodukte der Zersetzung der Humusstoffe infolge der optimalen Tätigkeit der cellulosezersetzenden Bakterien am schnellsten und stärksten verarbeitet werden, auch die höchsten p_H-Werte auftreten müssen. Die niedrigsten p_H-Werte müssen dagegen dort auftreten, wo infolge des ungünstigen Ganges der Cellulosezersetzung deren saure Nebenprodukte vorherrschen.

Das quantitative Verhalten der Bodenalgen.

Wenn auch Bodenbakterien und Bodenpilze bei den Lebensvorgängen und bei den verschiedenen Stoffkreislaufen des Bodens eine besonders wichtige Rolle spielen, so soll damit keineswegs geleugnet werden, daß aller Wahrscheinlichkeit nach auch die Bodenalgen eine nicht zu unterschätzende Funktion ausüben. Wenn wir auch von ihrer recht frag-

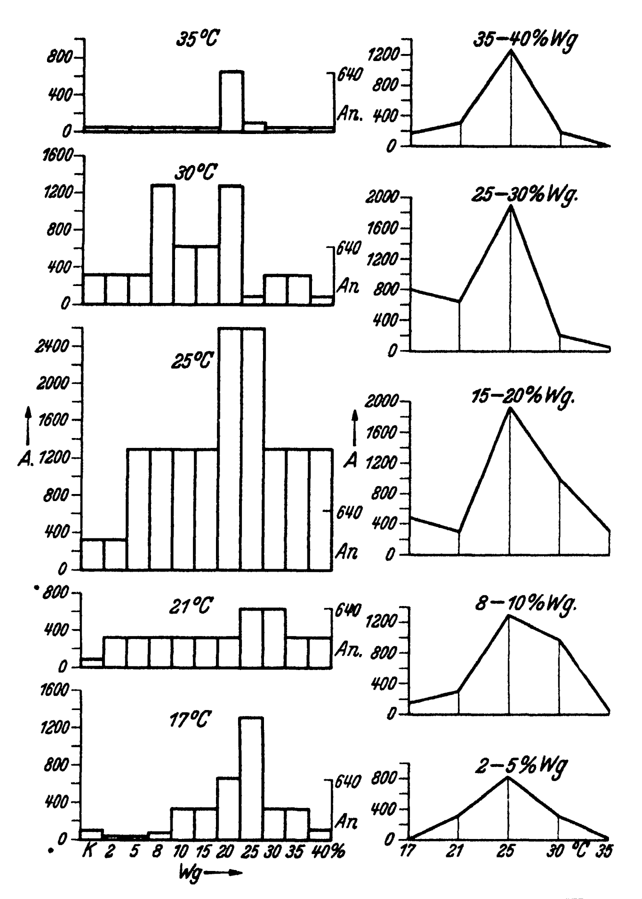


Abb. 6. *A* = Algen; *K* = Kontrollprobe; *An* = Anfang; *Wg* = Wassergehalt

würdigen Fähigkeit, den atmosphärischen Stickstoff zu binden, absehen, so bleibt noch immerhin ihre wichtige Assimilationsfähigkeit bestehen, mit Hilfe deren sie die tieferen Bodenschichten mit Sauerstoff versorgen können. Daß diese Sauerstoffmengen den aeroben Lebensvorgängen der übrigen Bodenmikroorganismen zugute kommen, braucht vielleicht nicht näher erklärt zu werden. Über die Ökologie der Bodenalgen sind die Ansichten heute nicht vollkommen einheitlich. Diese Mikroorganismen hat

man nämlich früher ausschließlich als Mikroorganismen der Gewässer betrachtet. Die späteren Forschungen haben dann ihr Vorkommen im Boden in einem immer größeren Umfange nachgewiesen. Unsere Untersuchungen haben nun, wie das die Abb. 6 zeigt, zu dem bemerkenswerten Ergebnis geführt, daß die optimalen Feuchtigkeits- und Temperaturbereiche dieser Mikroorganismen mit denen der Mehrzahl der Bodenbakterien vollkommen übereinstimmen. Sie erreichen ihre optimale Entwicklung bei 25° C und 25 % Wg., also bei 66 % der Wk. Besonders auffallend ist ihr starkes Vorkommen bei den ganz niedrigen Feuchtigkeitsgraden; das stimmt sehr gut mit den Ergebnissen überein, die *Fehér* bei der Erforschung der extrem trockenen Wüstenböden der Sahara gewonnen hat [*Killian* und *Fehér* (4)]. Gegen die höheren Temperaturgrade sind einige Arten recht empfindlich, dagegen vertragen sie in ihren optimalen Temperaturbereichen noch sehr gut die höheren Feuchtigkeitsgrade.

Das geschilderte Verhalten beweist uns ihre weitgehende Anpassung an die besonderen Verhältnisse des Landlebens. Zum Beweise dessen, daß sie auch bezüglich ihrer Assimilationstätigkeit an die besonderen Strahlungsenergieverhältnisse der Bodenräume angepaßt sind, verweisen wir auf unsere Arbeit uber die Bodenalgen (5).

Die Beeinflussung der optimalen Grenze des Wassergehaltes durch die Wasserkapazität des Bodens.

Daß die jeweilige Höhe der Wasserkapazität die Lage des Optimumbereiches der Bodenfeuchtigkeit ganz wesentlich beeinflussen wird, war uns von vornherein klar. Infolge der Umständlichkeit der Versuchsmethodik war es jedoch unmöglich, Paralleluntersuchungen in größerer Ausdehnung einzusetzen. Um jedoch auch in dieser Hinsicht gewisse Anhaltspunkte gewinnen zu können, haben wir einige Vergleichsuntersuchungen auch mit anderen Böden durchgeführt.

Hierzu wurden zwei Bodentypen verwendet, und zwar der Boden der Versuchsfläche B/12. Lehmiger Boden, entnommen von einem Weizenfelde in 20 cm Tiefe, und der Boden der Versuchsfläche 24, sandiger Lehmboden, auf der seit 6 Jahren brachliegenden Kontrollfläche ebenfalls in 20 cm Tiefe entnommen. Beide Boden wurden nach der Bestimmung der absoluten Wk. 8 Tage lang im Thermostaten bei 25° und verschiedenen Feuchtigkeitsgraden gehalten, und sodann auf den Gesamtbakteriengehalt (aerob und anaerob) untersucht mit folgendem Ergebnis (Tabelle II a. f. S.):

Zur Ergänzung bemerken wir, daß in unserem ursprünglichen Versuchsboden 20 b der Bakteriengehalt den höchsten Wert bei 25 % Wg. erreicht. Da der Boden selbst eine Wk. von 38 Gew.-% hatte, entspricht dieser Feuchtigkeitsgrad 66 % der Wasserkapazität. Durch Einstellung von Zwischenstufen wäre es natürlich möglich, diese Grenzzahlen noch genauer festzulegen. Aber schon auf Grund dieser Ergebnisse

Tabelle II.

Wassergehalt des Bodens in Gew.-%	Boden von			
	B/12 (Wk. 38 Gew.-%)		Versuchsfläche 24 (Wk. 28 Gw.-%)	
	Wassergehalt in % der Wk.	Bakteriengehalt je g	Wassergehalt in % der Wk.	Bakteriengehalt je g
10	30	$379 . 10^5$	36	$368 . 10^5$
13	39	$545 . 10^5$	—	—
20	61	$560 . 10^5$	71	$400 . 10^5$
25	76	$377 . 10^5$	89	$331 . 10^5$
30	91	$335 . 10^5$	—	—

Gew.-% = Gewichtsprozent; Wk. = Wasserkapazität.

können wir feststellen, daß der optimale bzw. der biologische wirksamste Wassergehalt des Bodens bei Feuchtigkeitsgraden liegt, die ungefähr 60 bis 80 % der Wasserkapazität entsprechen. Wenn wir die physiologischen Bakteriengruppen berücksichtigen, so können wir auf Grund der bereits mitgeteilten Ergebnisse folgendes festellen.

	Temperaturoptimum	Feuchtigkeitsoptimum	
		Wassergehalt in % auf den Boden bezogen	Wassergehalt in % der Wasserkapazität
Nitrifizierende Bakterien	30—35°	30	79
Stickstoff bindende Bakterien . . .	25°	25	66
Cellulose zersetzende Bakterien . .	25°	30	79
Sonstige Bodenbakterien	25°	25	66
Bodenpilze	25°	15	40
Bodenalgen	25°	25	66

Nach dieser Zusammenstellung bewegen sich die Grenzen des optimalen Wassergehaltes des Bodens, wenn man von den größtenteils aeroben Bodenpilzen absieht, fast für alle Bodenmikroorganismen zwischen 66 und 79 % der maximalen Wasserkapazität. Wird daher der Boden mit Wasser gesättigt, so wird das infolge von Störung der Luftzufuhr für das Leben der Mikroorganismen bereits hemmend wirken.

Auffallend ist auch die deutliche Anpassung der Bodenalgen an dieses Verhältnis. Wenn wir jetzt noch die Kurven der Abb. 7 (S. 267) vergleichen, so sehen wir, daß sich bei unserem Versuchsboden die Temperaturwirkung erst bei Feuchtigkeitsgraden erheblich geltend macht, die über 8 bis 10 % Wg. bzw. 21—26 % der Wk. liegen. Der Wirksamkeitsbereich kann daher für das Mikroorganismenleben des Bodens mit 26—80 % der maximalen Wasserkapazität angegeben werden.

Auf dem hier kurz behandelten Gebiete harren unserer Ansicht nach noch manche ungelöste Fragen der Beantwortung durch wissenschaftliche Bearbeitung.

Die mathematisch-analytischen Grundlagen des *R*-Gesetzes (6).

Es ist das selbstverständliche Ziel jeder biologischen Forschungsarbeit, ihre durch induktive Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse in mathematischer Form auszudrücken. Durch sie wird nämlich der quantitative Zusammenhang klar und übersichtlich dargestellt. Allerdings begegnet bei der Unzulänglichkeit der biologischen Forschungsmethoden, die im Verhältnis zu der äußersten Kompliziertheit der Naturvorgänge noch als primitiv bezeichnet werden müssen, ein exakter mathematischer Ausdruck der auf dem experimentellen Wege ermittelten Zusammenhänge fast immer Schwierigkeiten. Zwischen den unsicheren Methoden der biologischen Forschung und zwischen den klaren Verfahren der Mathematik besteht noch immer eine Kluft, die vorläufig noch schwer zu überbrücken ist. Es ist daher selbstverstandlich, daß das Bestreben der mathematischen Behandlung der biologischen Forschungsergebnisse darin bestehen soll, die Mathematik vorläufig als ordnenden Geist in der komplizierten Welt der organischen Naturvorgänge zu verwenden. Der mathematische Ausdruck soll daher vorläufig in erster Reihe die Form und nur bedingt und nur in zweiter Reihe den Inhalt angeben. Er soll aber keinesfalls dazu dienen, um uns zu einer Vernachlässigung der induktiven, experimentellen Methoden zu verleiten.

In der mathematischen Behandlung der Ergebnisse sind wir auf dem Gebiete der Chemie und Physik schon weit vorgeschritten und konnen alle chemisch-physikalischen Reaktionen mit ihren beeinflussenden Faktoren im Laboratoriumsversuch mit den exakten Methoden der Chemie und der Physik auch quantitativ klar erfassen. In einer vollig anderen Lage befinden wir uns auf dem Gebiete der biologischen Forschung. Auch dann, wenn wir des guten Glaubens sind, daß es uns gelungen ist, die beeinflussenden Faktoren sicher und klar in der Hand zu halten, müssen wir bekennen, daß auch in diesem Falle noch eine große Wahrscheinlichkeit besteht, daß wir nicht mit einem, sondern mit einer Reihe von Faktoren zu tun haben, die wir vorläufig weder in ihrem Wesen noch ihrer Wirkung nach klar erkennen und exakt und quantitativ erfassen konnen.

Es war bei den früher durchgeführten Freilanduntersuchungen noch nicht möglich, das innere Wesen und den komplexen Aufbau des *R*-Gesetzes zu ergründen. Erst auf Grund der jetzt durchgeführten letzten umfangreichen experimentellen Forschungen ist es uns geglückt, die mathematisch-analytischen Grundlagen der Gesamterscheinung klarzustellen. Um die folgenden Erörterungen richtig verstehen zu können, müssen wir vor allem folgendes feststellen:

Jeder Boden bildet als Lebensraum, in seiner Gesamtheit mit seinem Lebewesen und mit seinen organischen und anorganischen Energiequellen, eine bioenergetische Einheit, die ihre Lebensäußerungen nur zwischen den Grenzen durchzuführen vermag, die durch ihre biologische, biophysikalische und biochemische Konstitutionsbedingungen a priori gegeben sind. Innerhalb dieser bereits vorhandenen Grenzen sind nun die Änderungen der Wärme als Energiequelle und des Wasserfaktors als regulierenden Komponenten jene Induktionskräfte, die die quantitativen Lebensäußerungen des Bodenlebens hervorrufen.

Die Wirkungen dieser zwei Biofaktoren können aber voneinander nie getrennt werden. Sie gehören untrennbar zusammen. Sie begleiten und beeinflussen sich im komplexen Sinne gegenseitig derart, daß die Änderungen des einen immer als Folgeerscheinung von denen des anderen aufgefaßt werden können.

Die Wärme ist zweifelsohne die primäre Energiequelle jedes biodynamischen Vorganges und infolgedessen auch des Lebens selbst. Der Wasserfaktor als wesentlicher und unentbehrlicher Bestandteil des lebenden Protoplasmas reguliert die Wirkung der Temperatur.

Aus diesen Feststellungen müssen wir aber den Satz ableiten: daß die Wirkungen der Bodentemperatur und des Wassergehaltes als komplexe miteinander zusammengehörende und immer gleichzeitig wirkende biodynamische Erscheinungen berücksichtigt werden müssen.

Sie können die Lebensvorgänge im positiven und negativen Sinne beeinflussen, haben also ihre Wirkungsgrenzen und ihre optimalen Wirkungsbereiche, die bei ihren 0-Werten beginnen und bei der Grenze enden, wo ihre fördernde Wirkung in die hemmende übergeht. Diese Grenze bezeichnen wir als „Optimumgrenze". Aus der komplexen Wirkungsweise der beiden genannten Faktoren folgt aber auch, daß, wenn einer von ihnen seine optimalen Grenzen nach unten oder nach oben überschreitet, dies auch die fördernde Wirkung des anderen hemmt. Daher hat *Fehér* seinerzeit durch Multiplikation der numerischen Werte der beiden Faktoren Bodentemperatur und Bodenfeuchtigkeit, die wir künftig kurz als *Bt* und *Bf* bezeichnen werden, das Produkt „*R*" gebildet und dieses mit den quantitativen Änderungen der zugehörigen Mikroorganismenzahlen (*Mg*) in Zusammenhang gebracht. Die zwei Faktoren, Temperatur und Wassergehalt, sind zwei grundwichtige bioenergetische Komponenten der Lebensaktivität der Mikroorganismen des Bodens. Aus diesen beiden Komponenten entsteht als resultierender Energiefaktor als der Ausdruck ihrer komplexen Zusammenwirkung das Produkt „*R*" [resultierender Faktor (1)].

Die optimalen Grenzen von *Bt* und *Bf* der verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen sind für jede Bodengattung gegebene Werte, deren Veränderlichkeit hauptsächlich durch die physikalischen Konstitutionsbedingungen der verschiedenen Böden bedingt wird. Die Temperaturgrenzen werden hauptsächlich durch die spezifische Wärme und durch das Wärmeleitungsvermögen beeinflußt. Wie die bisherigen Ergebnisse dieser und der früheren Forschungen zeigen, sind ihre Schwankungen für eine und dieselbe Gruppe von Mikroorganismen praktisch verhältnismäßig gering.

Die optimalen oberen Grenzen des Wirkungsbereiches des Faktors *Bt* liegen zwischen 25 bis 35°. Die untere Grenze liegt theoretisch bei 0° C. Die optimale Grenze des Faktors *Bf* ist in der Regel größeren

Schwankungen unterworfen, sie hängt in der Regel von der Größe der Werte der maximalen Wasserkapazität ab und liegt bei Feuchtigkeitsgraden, die ungefähr 66 bis 80 % der in Gewichtsprozenten ausgedrückten Werte der maximalen Wasserkapazität betragen (*Bf*-Werte von ungefähr 15 bis 30 Gew.-%, je nach Bodengattung).

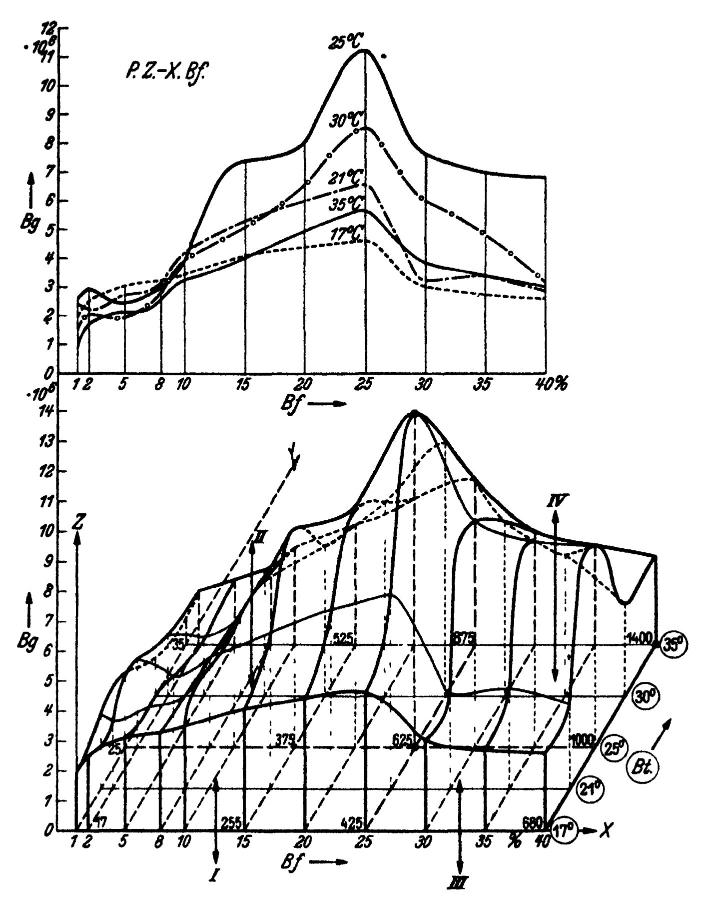


Abb. 7. Die Darstellung des *R*-Gesetzes im Raumkoordinatensystem. Auf der *x*-Achse ist die Bodenfeuchtigkeit (*Bf*) in Prozenten, auf der *z*-Achse der Bakteriengehalt (*Bg*) und auf der *y*-Achse die Bodentemperatur (*Bt*) eingetragen. Parallel mit der *x*-Achse laufen die *Bf*-Kurven und parallel mit der *y*-Achse die *Bt*-Kurven. Oberhalb des Raumkörpers befindet sich die Projektion *z*—*x* mit den *Bf*-Kurven.

Die theoretische untere Grenze liegt auch hier bei dem Werte 0, der aber nach *Killian* und *Fehér* (4) in der freien Natur, selbst in den trockensten Wüstenböden, nicht erreicht wird und nur künstlich im Laboratorium verwirklicht werden kann.

Aus diesen Überlegungen folgt aber auch, daß zu der richtigen und vollständigen analytisch-mathematischen Erfassung und Ergründung des *R*-Gesetzes die analytische Darstellung in der Ebene nicht mehr genügt, das vielmehr der Weg der räumlichen Darstellung mit Hilfe der Raumkoordinaten betreten werden muß. Als typisches Beispiel haben wir zunächst die Änderungen des Bakteriengehaltes in ihrer Abhängigkeit von den *R*-Werten räumlich dargestellt (Abb. 7 und 8).

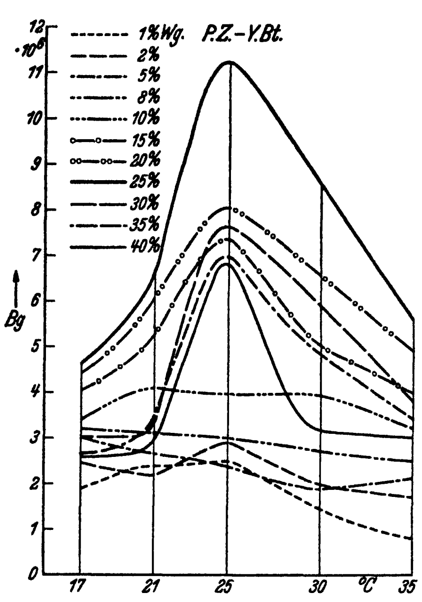


Abb. 8. Projektion z—y mit den *Bt*-Kurven auf Grund des Raumkorpers der Abb. 7. *Bg* = Bakteriengehalt; *Wg* = Wassergehalt

Es wurden hierbei auf die x-Achse die *Bf*, auf die y-Achse die *Bt* und auf die z-Achse die *Bg* (Bakteriengehalts)-Werte aufgetragen. Auf Grund der Analyse des so gewonnenen Raumbildes können wir nun folgende grundlegende Gesetzmäßigkeiten ableiten.

1. Die *R*-Werte werden in der x—y-Ebene des Raumkoordinatensystems an den Punkten gebildet, an denen die Koordinaten der $Bt(y)$- und $Bf(x)$-Werte sich schneiden. Ihre Lage wird also durch die korrespondierenden Werte *Bt* und *Bf* unzweideutig bestimmt.

2. Über jedem Kreuzungspunkte befinden sich auf den z-Koordinaten die zugehörigen *Bg* bzw. *Mg*-Zahlen. Diese werden also durch die Lage der *R*-Werte in dem Raumkoordinatensystem bestimmt.

3. Verbindet man die *Bg*-Zahlen mit den Raumkurven, die parallel mit der x-Achse laufen, so bekommen wir die Wirkung der Änderungen des *Bf*-Faktors bei verschiedenen Temperaturen. Diese Kurven bezeichnen wir als *Bf*-Kurven.

4. Werden nun die *Bg*-Zahlen auch parallel mit der y-Achse verbunden, so bekommen wir jene Raumkurven, welche die Temperaturwirkung bei verschiedenen *Bf*-Werten darstellen. Diese sind die *Bt*-Kurven. In den Abb. 7 und 8 erscheinen diese Kurven in Projektionen in der z—x- und in der z—y-Ebene.

5. Auch die Kreuzungspunkte dieser Raumkurven bestimmen jetzt die Lage der *Bg*-Werte. Die *R*-Werte sind also Schnittpunkte der x- und y-Koordinaten und die *Bg*-Zahlen Kreuzungspunkte der *Bt*- und *Bf*-Kurven.

6. Die x—y-Ebene wird nun durch die *Bt*- und *Bf*-Werte, welche die obere Grenze des Optimumbereiches charakterisieren, in vier Vierecke geteilt. Über diesen liegen jetzt die vier Segmente der Mantelfläche des mit den *Bt*- und *Bf*-Kurven dargestellten Raumkörpers.

7. Der höchste *Bg*-Wert wird immer über dem Schnittpunkte der beiden optimalen *Bf*- und *Bt*-Koordinaten liegen. Wird daher entweder der eine oder der andere Faktor seine optimale Grenze überschreiten, so wird

in seinem Wirkungsmechanismus der hemmende Anteil allmählich die Oberhand gewinnen und das Wachstum der Mikroorganismen im negativen Sinne beeinflussen.

8. Aus diesen Überlegungen folgt aber auch die wichtige Feststellung, daß die Wirkung des R-Faktors von dem Umstand, ob das Produkt von R von solchen Bt- und Bf-Faktoren gebildet wurde, die ihre optimalen Grenzen noch nicht oder schon überschritten haben, entscheidend beeinflußt wird. Es können daher die gleichen numerischen Werte von R je nach der Lage ihrer Komponenten hemmend oder fördernd wirken. Der jeweilige biodynamische Wert des R-Faktors wird also von der Lage seiner Komponenten,

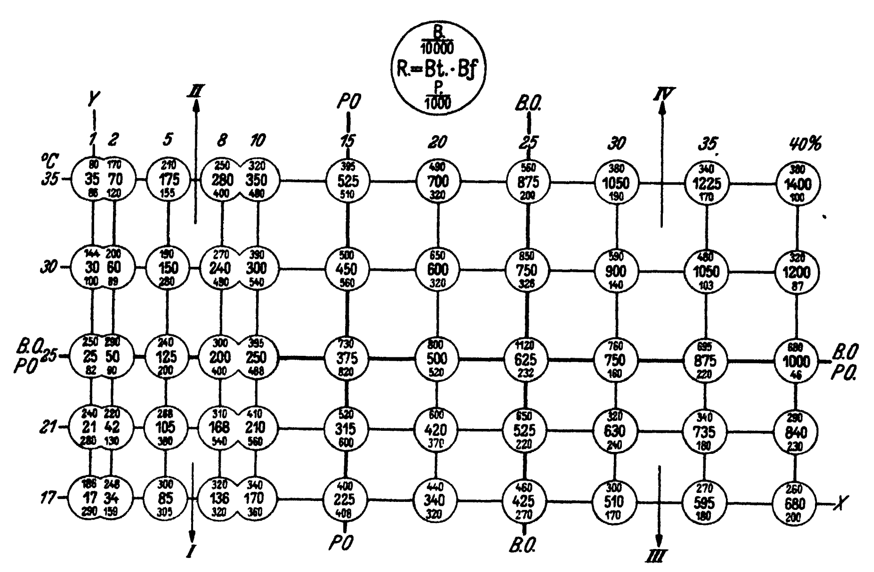


Abb. 9. Die Quadrate der x—y-Ebene Bt = Bodentemperatur; Bf = Bodenfeuchtigkeit; BO = Optimumgrenze des Bakterienwachstums, PO = Optimumgrenze des Pilzwachstums; Bakteriengehalt (B) = B/10000, Pilzgehalt (P) = P/1000.

die diese den Optimumgrenzen gegenüber einnehmen, entscheidend beeinflußt. Es können die R-Werte von gleicher numerischer Höhe miteinander und gegenseitig in keiner Hinsicht vertauscht oder ersetzt werden. Mit anderen Worten: Man kann daher R-Werte, die durch diejenigen Bt- und Wg-Werte gebildet wurden, die innerhalb des Optimumbereiches der verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen liegen, nicht durch solche R-Werte ersetzen, in denen eine oder beide Komponenten die Optimumgrenze überschritten haben. *Die Beachtung dieser Regel ist bei der Auswertung des R-Gesetzes fundamental wichtig.*

9. Die vier Quadrate der x—y-Ebene können jetzt analytisch und biologisch charakterisiert werden. Wir werden sie nach ihrem größten R-Wert eingeordnet nach der Reihe als I., II., III. und IV. x—y-Vierecke bezeichnen (Abb. 9).

Viereck I enthält alle R-Werte, deren Komponenten, also die Werte von Bf und Bt, optimal oder unteroptimal sind. Die korrespondierenden Mg-Zahlen zeigen bis zu dem Optimum steigende Reihe. Der Zunahme

der *R*-Werte folgt hier also immer eine Zunahme der *Mg*-Zahlen. Es wirken hier also beide Faktoren *Bt* und *Bf* physiologisch fördernd.

Im *Viereck II* finden wir alle *R*-Werte, die von den überoptimalen *Bt*-Zahlen und von den unter optimalen *Bf*-Werten abgeleitet werden. Der Steigerung der Werte entspricht hier nur bis zu einer gewissen Grenze eine Zunahme der *Mg*-Zahlen. Bei den höchsten *R*-Werten tritt bereits eine Verminderung der *Mg*-Werte ein. Der Faktor *Bt* wirkt hier hemmend, der Faktor *Bf* fördernd.

Viereck III enthält die als Produkte der unteroptimalen *Bt*-Zahlen mit den überoptimalen *Bf*-Werten gebildeten *R*-Werte. Im Bereiche der *Bf*-Kurven bringt die Erhöhung der *R*-Werte immer eine Verringerung der *Mg*-Zahlen. Die *R*-Werte der *Bt*-Kurven verhalten sich umgekehrt. Der Faktor *Bf* wirkt hier also ausdrücklich hemmend, der Faktor *Bt* fördernd.

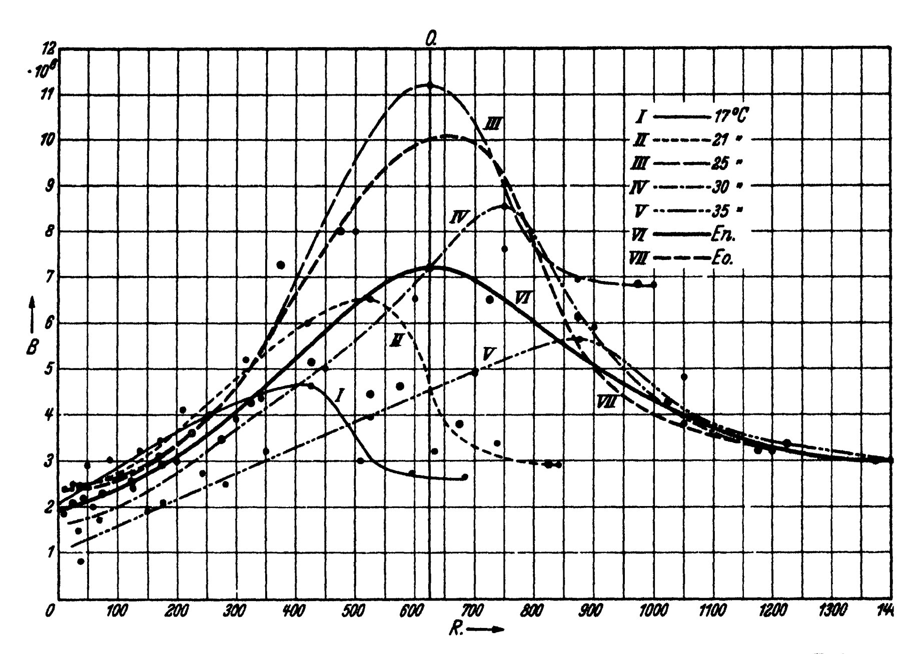


Abb. 10. Die Darstellung des Zusammenhanges zwischen Bakteriengehalt (*B*) und *R*-Werten in der *x*—*y*-Ebene nach den verschiedenen Temperaturgraden. *O* = Optimumgrenze; *En* = mediane Ausgleichkurve; *Eo* = Optimumkurve.

Im *Viereck IV* werden wir dagegen nur solche *R*-Werte finden, die von den überoptimalen *Bt*- und *Bf*-Werten gebildet werden. Es wirken hier beide Faktoren hemmend. Dementsprechend wird hier auf die Vergrößerung der *R*-Werte immer eine Abnahme der *Mg*-Zahlen erfolgen.

Von diesen Vierecken wird die größte Wichtigkeit das Viereck I bekommen. Über der Grundfläche dieses Vierecks liegen alle *Mg*-Zahlen bzw. -Werte, die dem sogenannten Optimumgebiet angehören, also *Bt*- und *Bf*-Werte, die alle physiologisch fördernd wirken. Bei allen biologischen Naturvorgängen sind natürlich die bioenergetischen Eigenschaften des Optimumgebietes die entscheidenden. Für das Verständnis des biologischen Geschehens ist es daher wichtig, den Gang der sogenannten Optimumkurve

darzustellen, die die optimale Entwicklung und den optimalen Ablauf eines Lebensvorganges darstellt.

Ganz besonders wichtig ist aber die Erkenntnis, daß auch in dem System der Raumkoordinaten nur eine Kurve vorhanden ist, die, ohne die optimalen Werte von R bzw. Bt und Bf zu überschreiten, die niedrigsten quantitativen Lebensstufen mit den höchsten verbinden.

10. Die Darstellung des absteigenden Astes der Optimumkurven hat nur theoretisches Interesse. Wir haben vollständigkeitshalber diesen Gang der Optimumkurve über dem Viereck IV dargestellt, die dann die optimalen Mg-Zahlen und R-Werte mit den niedrigeren Mg-Werten und mit den diesen entsprechenden höchsten R-Werten verbindet.

Nachdem wir mit Hilfe der räumlichen Darstellungsmethode über das innere Wesen des R-Gesetzes die nötigen Sätze abgeleitet haben, können

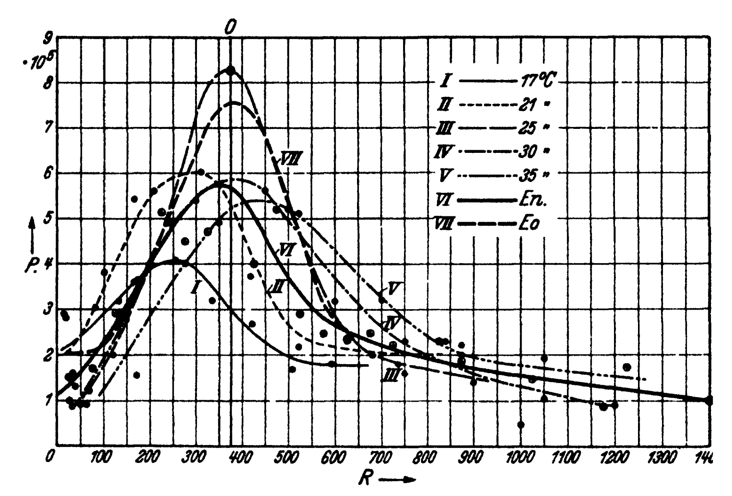


Abb. 11. Die Darstellung des Zusammenhanges zwischen Pilzzahl (P) und R-Werten in der x—y-Ebene nach den verschiedenen Temperaturgraden. O = Optimumgrenze; En = mediane Ausgleichskurve; Eo = Optimumkurve.

wir, um die späteren mathematischen Erorterungen einfacher zu gestalten, die bereits ermittelten Zusammenhange auch in der x—y-Ebene eines ebenen Koordinatensystems darstellen. Werden nämlich die R-Werte des Optimumgebietes, nach ihrem numerischen Wert geordnet, auf die x-Achse, die zugehorigen Bakterienzahlen auf die y-Achse eines ebenen Koordinatensystems aufgetragen, so wird natürlich die ganze Erscheinung in eine einfachere und übersichtlichere Form überführt.

Abb. 10 zeigt uns das so gewonnene Bild. Um die Lage der einzelnen Punkte auch mit dem Raumkoordinatensystem in Einklang bringen zu können, haben wir die einzelnen Punkte der Bf-Kurven miteinander verbunden und somit diese Kurven auch in der Ebene dargestellt. In der Abbildung haben wir auch die mediane Ausgleichskurve und den auf- und absteigenden Ast der Optimumkurve der Vierecke I und IV auf Grund der früher abgeleiteten Feststellungen konstruiert.

Für die Darstellung der Pilzkurve haben wir das gleiche Verfahren angewendet (siehe Abb. 11). Die Darstellung des Raumkoordinatenbildes war jedoch hier nicht mehr notwendig, da auf Grund der bereits abgeleiteten

Grundsätze die Bestimmung der R-Werte, die die Lage der Optimumkurve und der dieser entsprechenden überoptimalen Kurve bestimmen, mit Hilfe der experimentell ermittelten Optimumgrenzen in der x—y-Ebene (Abbildung 11) des Raumkoordinatensystems ohne weiteres durchgeführt werden konnte.

Die mathematische Berechnung der Optimumkurven.

Die mathematische Behandlung von Ergebnissen, die gewisse klar erkennbare Zusammenhänge aufweisen, ist für die Darstellung in der Ebene vom rein technischen Standpunkt aus in der Regel ohne jede Schwierigkeit zu handhaben. Wir können also die Ergebnisse jeder Beobachtung oder jedes Experiments durch eine entsprechende Behandlung des Untersuchungsmaterials als eine Funktion n-ter Ordnung von irgendeinem variablen Faktor darstellen. Dazu dienen in der Mathematik die Potentialgleichungen nach der allgemeinen Form: $y = Ax^3 + Bx^2 + Cx + D$, oder für unseren Fall: $Mg = AR^3 + BR^2 + CR + D$.

Um die gewonnenen Ergebnisse durch derartige Gleichungen auszudrücken, stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Bei allen kommt es vor allem darauf an, die Konstanten dieser Gleichungen bzw. Kurven zu bestimmen. Man benutzt hierzu entweder das graphische Ausgleichsverfahren mit den Tangenten auf Grund von Differentialgleichungen, oder eine der bekannten Interpolationsformeln. Durch die Verwendung dieser Formeln war *Fehér* schon seinerzeit imstande, den Zusammenhang zwischen den Änderungen des R-Faktors (als des x-Variablen) und des Bakteriengehaltes (als des y-Variablen) durch Parabelgleichungen 3. bzw. 4. Ordnung mit guter Annäherung darzustellen (2). Diese Gleichungen wurden auf Grund von Ergebnissen der Freilandbeobachtungen an Waldboden und auf Grund von experimentellen Versuchen aufgebaut.

Wir haben diesmal zunächst durch die Verwendung der Interpolationsformel von *Lagrange* den gleichen Weg betreten. Schon die ersten Gleichungen haben für die fraglichen Zusammenhänge S-förmige Kurven mit einem ausgeprägten Minimum und Maximum mit einem dazwischenliegenden Wendepunkt gegeben. Da die meisten Versuche, die in dieser Richtung angestellt wurden, nur den aufsteigenden Ast der Kurve zu erfassen versuchten, so sind dadurch die sogenannten Optimumkurven entstanden. Um uns jedoch auch über die allgemeine Richtung des absteigenden Astes unserer Kurven zu orientieren, haben wir bei einigen unserer Kurven, wo es möglich war, auch einen Teil des absteigenden Kurvenastes dargestellt. Auch für die Darstellung dieser Kurvenformen lassen sich natürlich die bereits erwähnten Parabelgleichungen mit gutem Erfolg verwenden.

Bei der näheren Betrachtung des aufsteigenden Astes fiel uns jedoch sehr bald auch der exponentiale Charakter dieses Kurvenstückes auf. Wir haben infolgedessen auch versucht, die exponentiale Natur dieses Kurventeiles durch eine entsprechende Exponentialgleichung auszudrücken.

Für die praktische Verwendung der anfangs erwähnten Parabelgleichungen ist es nämlich besonders wichtig, daß sie möglichst wenig Konstanten besitzen. Man soll daher mit möglichst kleinen Potenzen arbeiten. Durch die Anwendung der Exponentialgleichung wird man aber in die Lage versetzt, die Zahl der Konstanten zu verringern und sie mit größerer Sicherheit auszuwählen und zu berechnen. Außerdem bieten die

Exponentialgleichungen den großen Vorteil, daß man die einzelnen Konstanten für die Deutung und Charakterisierung des Kurvenverlaufes verwenden und miteinander vergleichen kann. Für die Verwendung der Exponentialgleichung ist in der letzten Zeit durch umfangreiche Arbeiten *Janischs* (6) eine gute und brauchbare Grundlage gelegt. Auf Grund unserer Untersuchungen kamen wir zu dem Ergebnis, daß der aufsteigende Ast unserer Kurven am einfachsten und sichersten durch die allgemeine Exponentialgleichung

$$\frac{1}{y} = \frac{1}{2}\left[m a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\left(a_2^x + a_2^{-x}\right)\right]$$

oder für unseren Fall

$$\frac{1}{Mg} = \frac{1}{2}\left[m a_1^{1/R} + \frac{m}{2}\left(a_2^R + a_2^{-R}\right)\right]$$

dargestellt werden kann. Um entsprechende Zahlen zu erhalten, haben wir aus technischen Gründen an Stelle von $1/y$ den Ausdruck $100/y$ verwendet. *Mg* bedeutet die jeweiligen Mikroorganismenzahlen.

Bei der näheren Betrachtung dieser Gleichung, die in dieser Fassung eine sogenannte reziproke Exponentialgleichung bedeutet, begegnen wir zunächst einigen Konstanten. Für die Charakterisierung dieser Konstanten möge folgendes bemerkt werden. Die Größe des Konstanten m bewegte sich bei unseren Versuchen zwischen 1,0 bis 4,00. Die beiden Konstanten a_1 und a_2 sind die sogenannten Richtungskonstanten. Sie bestimmen den Kurvenverlauf: a_1 ist charakteristisch fur die niedrigen Werte und a_2 für die hoheren Werte von x und y bzw. von R und Mg.

Tabelle III. Vergleichende Darstellung der Konstanten der Parabel- und der Exponentialgleichungen.

Mg	Parabelgleichungen							Exponentialgleichungen		
					Wendepunkte					
					in Teilen der x-Achse					
	A	*B*	*C*	*D*	Gesamtteilung	Wendepunkt	Wp. in % der Länge der x-Achse	*m*	a_1	a_2
Bg.	– 8,25	+ 110 75	– 294,5	+492	7	4,8	68	3,2	3,4	10
P.	– 0,513 979	+ 18,837 786	– 58,676 47	+265,349	15	9	60	4,0	3,8	10
A.	– 4,387 96	+ 96,394	– 343,17	+511,16	13	7,3	56	1,0	4,0	9
Nf.	– 6,084 7	+ 107,4	– 279,64	+778,3	11	5,8	52	1,1	3,8	10
Dnf.	+ 55	– 413	+ 956	–560	4	2,5	62,5	2,4	2,2	9
Nb.	– 5,714 46	+ 94,288	302,87	+314,0	9	4,9	61	2,6	3,6	10

In der Tabelle III bringen wir eine vergleichende Übersicht über die verschiedenen Konstanten der von uns angewandten Potentialgleichungen. Sie können sehr gut zum Vergleich und zur Charakterisierung der einzelnen Kurven verwendet werden.

Wir haben vergleichsweise durch Differenzieren nach der allgemeinen Formel der Gleichung $y = Ax^3 + Bx^2 + Cx + D$ auch die Wendepunkte unserer S-Kurven mit dem zweiten Differentialquotient ($y'' = 6\,A_x + 2\,B$) berechnet und in der Tabelle zusammengestellt. Sie können neben den übrigen Konstanten ebenfalls sehr gut für die vergleichende Charakterisierung der einzelnen Kurven verwendet werden.

Obwohl durch diese Gleichungen eigentlich nur auf experimentellem Wege gewonnenen Feststellungen mathematisch ausgedrückt und charakterisiert werden, so ermöglichen sie uns doch einen weiteren Schritt und eine Vertiefung auf dem Gebiete der quantitativen Bearbeitung der bodenbiologischen Untersuchungsergebnisse. Wir haben schon in einer früheren Arbeit (2 b) gezeigt, daß man auf experimentellem Wege für eine jede Bodenart die verschiedenen Werte von R und die dazugehörigen Mg-Zahlen experimentell herstellen kann. Bestimmt man jetzt diese R-Werte derart, daß der eine für den Anfangsgang der Kurve, also bei niederen R-Werten, ermittelt wird, und den zweiten derart, daß er den Kulminationspunkt der Kurve charakterisiert, so gewinnt man bereits zwei Kardinalpunkte der Exponentialkurve. Bestimmt man noch durch entsprechende Versuchsanordnung je einen R-Wert und die zugehörige Mikrobenzahl ungefähr vor und nach dem Wendepunkt der Kurve, so kann man die entsprechende Potential- oder Exponentialgleichung aufstellen und die übrigen Werte, wenigstens annähernd quantitativ berechnen. Man kann also für die verschiedenen Böden ihre Konstanten a und m experimentell mit Zuhilfenahme dieser Exponentialgleichung ermitteln und diese dann zur Charakterisierung der biologischen Aktivität verwenden (2 b).

Es ist natürlich klar, daß die bezeichneten Gleichungen infolge der vielen Unzulänglichkeiten der angewendeten Untersuchungsmethoden nicht in allen Einzelheiten mit den graphisch konstruierten Ausgleichskurven der tatsächlich gefundenen Werte von x und y übereinstimmen können. Besondere Schwierigkeiten macht es, bei einigen Kurven den Anfang derselben durch die angewendeten Gleichungen zu charakterisieren. In diesen Fällen zeigte aber die nähere Betrachtung, daß infolge von inneren biologischen Ursachen dieser Teil der Kurve fast einen mit der x-Achse parallelen geradlinigen Verlauf hatte, und infolgedessen ein einheitlicher mathematischer Ausdruck nicht gut möglich wurde. Die innere Ursache dieser Erscheinung ist darin zu suchen, daß die meisten Mikroorganismen extrem niedrige Werte von Bt und Wg in der Form von Sporen oder in Dauerzuständen überleben können. Der eigentliche Mikroorganismengehalt des Bodens wird daher bei den niedrigsten R-Werten auch dann, wenn diese 0 erreichen, nie auf 0 herabsinken. Da jedoch je nach der Bodenbeschaffenheit bei den niedrigsten Bt-Werten der Faktor Wg und umgekehrt beinahe wirkungslos bleiben, so werden die ersten quantitativen Lebensreaktionen sich erst allmählich erhöhen, welche Erscheinung dann zu dem anfänglichen mit der x-Achse mehr oder weniger parallel verlaufenden Kurvenstück zum

Ausdruck kommen wird. Die Länge dieser Geraden ist je nach dem verschiedenen Verhalten der einzelnen Gruppen von Mikroorganismen recht verschieden. Wir werden auf diese Frage bei der Behandlung der einzelnen Kurven noch zurückkommen.

Bezüglich der Auswertung der Kurven ist noch folgendes zu bemerken: In den Tabellen haben wir auch die mittlere Abweichung und die $\pm$-Differenzen für beide Kurven, bezogen auf die Ausgleichskurve, berechnet. Wenn man die Unvollkommenheit der angewendeten Versuchsmethodik in Betracht zieht, so kann man von einer verhältnismäßig guten Übereinstimmung sprechen.

Kurve des Bakteriengehaltes
(siehe Abb. 12 und Tabelle IV).

Die Parabelfunktion und die eingelegte Kurve laufen ziemlich konform. Dies gilt auch für den absteigenden Ast der Parabel, deren Verlauf durch einige Koordinaten des Grenzgebietes (x—y-Viereck IV)

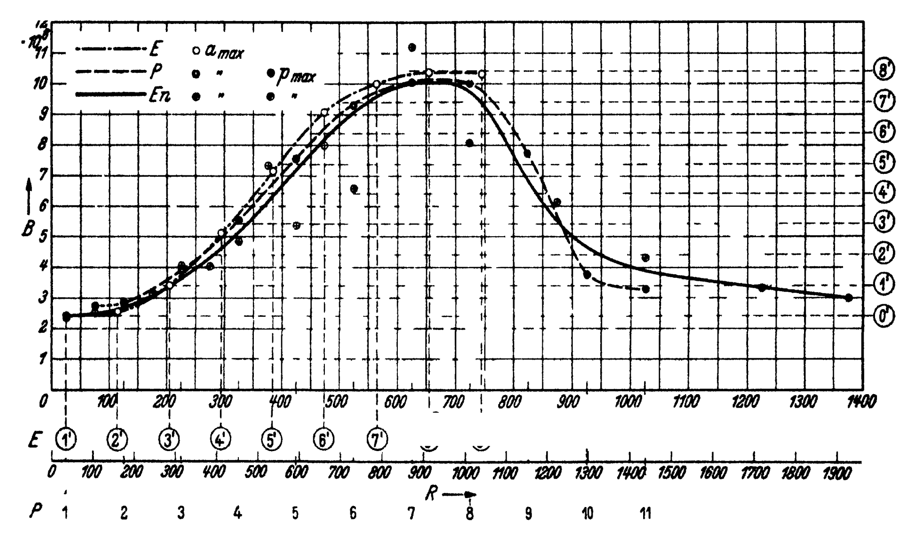


Abb. 12. Die Kurve des Bakteriengehalts. B = Bakteriengehalt; E = Kurve berechnet mit der Exponentialgleichung, P = Parabelkurve; En = eingelegte Kurve; a max = ante-Maximum; p max = post-Maximum; R-Werte, obere Reihe: Bodenfeuchtigkeit × Bodentemperatur; R-Werte, untere Reihe. Bodenfeuchtigkeit × (Bodentemperatur + 10).

im allgemeinen angegeben wurde. Bei der Berechnung der Exponentialgleichung mußte natürlich das Koordinatensystem etwas verschoben werden. Nach dieser Verschiebung stimmen die einzelnen Punkte im allgemeinen mit dem Verlauf der eingelegten Kurve innerhalb der gegebenen Möglichkeiten ziemlich uberein. Wie schon erwähnt, kann die Exponentialgleichung nach der Kulmination der Kurve nicht mehr benutzt werden. Nach diesem Punkte wurde nur die Parabelkurve

Tabelle IV.

x	P					
	R-Werte	Empirische Kurve y	Berechnete Kurve. y'	$\Delta' y = y' - y$	$\frac{100\, \Delta' y}{y} = \Delta' y$	
2	125	2600000	2800000	+ 200000	+ 7,69%	
3	225	3630000	3830000	+ 200000	+ 5,5	$\frac{\Sigma + \Delta' y}{n} = 5{,}98\%$
4	325	5200000	5580000	+ 380000	+ 7,31	
5	425	7200000	7570000	+ 370000	+ 5,13	
6	525	9000000	9300000	+ 300000	+ 3,33	
7	625	10000000	10270000	+ 270000	+ 2,7	
8	725	9720000	10000000	+ 280000	+ 2,88	$\frac{\Sigma - \Delta' y}{n} = 16{,}5\%$
9	825	6830000	7740000	+ 910000	+ 13,3	
10	925	4600000	3720000	— 880000	— 19,1	
11	1025	3830000	3300000	— 530000	— 13,9	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta' y}{n} = 8{,}084\%$	

Optimumgrenzen: 25° C *Bt*

$Py' = -8{,}25\, x^3 + 110{,}75\, x^2 - 294{,}5\, x + 492.$

Py' ist mit 10 000 zu multiplizieren.

* *Mg* = Mikroorganismengehalt.

Tabelle V.

x	P					
	R-Werte	Empirische Kurve y	Berechnete Kurve y'	$\Delta' y = y' - y$	$\frac{100\, \Delta' y}{y} = \Delta' y$	
2	50	206000	199000	— 7000	— 3,39%	
3	75	212000	200000	— 12000	— 5,66	
4	100	228000				
5	125	252000				
6	150	300000	300000	0	0	
7	175	348000				
8	200	404000				$\frac{\Sigma + \Delta' y}{n} = 2{,}97\%$
9	225	459000				
10	250	516000	548000	+ 32000	+ 6,2	
11	275	580000				
12	300	636000				
13	325	690000	711000	+ 21000	+ 3,06	$\frac{\Sigma - \Delta' y}{n} = 3{,}51\%$
14	350	731000				
15	375	752000	754000	+ 2000	+ 0,266	
16	400	748000				
17	425	727000	742000	+ 15000	+ 2,06	
18	450	678000				
19	475	610000	630000	+ 20000	+ 3,25	
20	500	539000	531000	— 8000	— 1,48	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta' y}{n} = 2{,}82\%$	

$Py' = -0{,}513\,979\, x^3 + 13{,}837\,786\, x^2 - 58{,}676\,47\, x + 265{,}349.$

Py' ist mit 1000 zu multiplizieren.

Optimumgrenze: 25° C *Bt*

* *Mg* = Mikroorganismengehalt.

Bakterien.

x	R-Werte	Empirische Kurve: y	Berechnete Kurve: y'	$\Delta' y = y'' - y$	$\frac{100 \Delta'' y}{y} = \Delta'' y$	
		E				
1′ 0,1	25	2400000	2430000	+ 30000	+ 1,2 %	$\frac{\Sigma + \Delta'' y}{n} = 6{,}5\%$
2′ 0,2	125	2600000	2530000	— 70000	— 2,69	
3′ 0,3	205	3400000	3440000	+ 40000	+ 1,17	
4′ 0,4	295	4620000	5140000	+ 520000	+ 11,2	$\frac{\Sigma - \Delta'' y}{n} = 2{,}69\%$
5′ 0,5	385	6300000	7090000	+ 790000	+ 12,5	
6′ 0,6	475	8190000	9060000	+ 870000	+ 10,6	
7′ 0,7	565	9600000	9970000	+ 370000	+ 3,85	
8′ 0,8	655	10050000	10340000	+ 290000	+ 2,8	
9′ 0,9	745	9450000	10280000	+ 830000	+ 8,7	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta'' y}{n} = 6{,}078\%$	

und 25 % *Bf.* (66 % der *Wk*)

$$\frac{100}{E y''} = \frac{1}{2}\left[m \cdot a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\left(a_2^{x} + a_2^{-x}\right)\right].$$

$a_1 = 3{,}4, \qquad a_2 = 10, \qquad m = 3{,}2.$

Mg-Wert* bei $0' = 2{,}4 \times 1\,000\,000 = 2\,400\,000$.

$E y''$ ist mit 1 000 000 zu multiplizieren.

Pilze.

x	R-Werte	Empirische Kurve y	Berechnete Kurve· y''	$\Delta'' y = y'' - y$	$\frac{100 \Delta'' y}{y} = \Delta'' y$	
		E				
1′ 0,1	25	204000	188000	16	— 7,8 %	$\frac{\Sigma + \Delta'' y}{n} = 4{,}20\%$
2′ 0,2	75	212000	186300	— 25700	— 11,6	
3′ 0,3	125	252000	237000	— 15000	— 5,95	
4′ 0,4	175	348000	349000	+ 1000	+ 0,29	$\frac{\Sigma - \Delta'' y}{n} = 8{,}45\%$
5′ 0,5	225	459000	489000	+ 30000	+ 6,5	
6′ 0,6	275	580000	625000	+ 45000	+ 7,75	
7′ 0,7	325	690000	714000	+ 24000	+ 3,47	
8′ 0,8	375	752000	762000	+ 10000	+ 1,3	
9′ 0,9	425	727000	770000	+ 43000	+ 5,9	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta'' y}{n} = 5{,}62\%$	

$$\frac{100}{E y} = \frac{1}{2}\left[m \cdot a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\left(a_2^{x} + a_2^{-x}\right)\right].$$

$a_1 = 3{,}8, \qquad a_2 = 10, \qquad m = 4{,}0.$

Mg-Wert* bei $0' = 1{,}8 \times 100\,000 = 180\,000$.

$E y''$ in Hunderttausenden.

und 15 % *Bf.* (40 % der *Wk*)

Tabelle VI.

x	P: R-Werte	Empirische Kurve: y	Berechnete Kurve: y'	$\Delta' y = y' - y$	$\frac{100 \Delta' y}{y} = \Delta' y$	
2	100	190	175	— 15	— 7,89 %	
3	150	211	231	+ 20	+ 9,47	
4	200	345	400	+ 55	+ 15,9	
5	250	577	657	+ 80	+ 13,8	$\frac{\Sigma + \Delta' y}{n} = 8{,}74\,\%$
6	300	844	974	+ 130	+ 15,4	
7	350	1165	1327	+ 162	+ 13,9	
8	400	1500	1688	+ 188	+ 12,5	
9	450	1850	2032	+ 182	+ 9,83	
10	500	2200	2331	+ 131	+ 5,9	$\frac{\Sigma - \Delta' y}{n} = 7{,}89\,\%$
11	550	2500	2560	+ 60	+ 2,4	
12	600	2645	2681	+ 36	+ 1,36	
13	650	2630	2700	+ 70	+ 2,66	
14	700	2520	2560	+ 40	+ 1,58	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta' y}{n} = 8{,}66\,\%$	

$$Py' = -4{,}38796\,x^3 + 96{,}394\,x^2 - 343{,}17\,x + 511{,}16.$$

Optimumgrenzen: 25° *Bt*

* *Mg* = Mikroorganismengehalt

Tabelle VII.

x	P: R-Werte	Empirische Kurve y	Berechnete Kurve y'	$\Delta' y = y' - y$	$\frac{100 \Delta' y}{y} = \Delta' y$	
1,5	100	53300	58000	+ 4700	+ 8,82 %	
2	150	54500	60000	+ 5500	+ 10,09	$\frac{\Sigma + \Delta' y}{n} = 7{,}35\,\%$
3	250	67500	74170	+ 6670	+ 9,88	
4	350	91000	98890	+ 7890	+ 8,67	
5	450	125400	130420	+ 5020	+ 4.00	
6	550	161000	165260	+ 4260	+ 2,66	
7	650	199640	199640	0	0	$\frac{\Sigma - \Delta' y}{n} = 1{,}16\,\%$
8	750	233250	229940	— 3310	— 1,42	
9	850	256520	252520	— 4000	— 1,56	
10	950	265700	263700	— 2000	— 0,75	
11	1050	263000	260500	— 2500	— 0,91	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta' y}{n} = 4{,}43\,\%$	

$$Py' = -6{,}0847\,x^3 + 107{,}4\,x^2 - 279{,}64\,x + 778{,}3.$$

P'y ist mit 100 zu multiplizieren.

Optimumgrenzen: 30—35° *Bt*

* *Mg* = Mikroorganismengehalt

Algen.

x	R-Werte	Empirische Kurve: y	Berechnete Kurve: y''	$\Delta'' y = y'' - y$	$\frac{100\,\Delta'' y}{y} = \Delta'' y$	
2	125	210	206	— 4	— 1,9 %	$\frac{\Sigma + \Delta'' y}{n} = 11{,}19\,\%$
3	200	345	390	+ 45	+ 13,04	
4	275	700	800	+ 100	+ 14,3	
5	350	1165	1330	+ 165	+ 14,1	
6	425	1670	1868	+ 198	+ 11,8	
7	500	2200	2260	+ 60	+ 2,72	$\frac{\Sigma - \Delta'' y}{n} = 2{,}11\,\%$
8	575	2590	2510	— 80	— 3,08	
9	650	2630	2594	— 36	— 1,36	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta'' y}{n} = 7{,}79\,\%$	

$$\frac{100}{Ey''} = \frac{1}{2}\left[m \cdot a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\left(a_2^{x} + a_2^{-x}\right)\right].$$

$a_1 = 4, \qquad a_2 = 9, \qquad m = 1.$

Mg-Wert* bei 0′ = 2×100 = 200.

Ey″ ist mit 100 zu multiplizieren.

ınd 25 % *Bf.* (60 % der *Wk*)

Nitrifizierende Bakterien

X	R-Werte	Empirische Kurve y	Berechnete Kurve y'	E $\Delta'' y = y'' - y$	$\frac{100\,\Delta'' y}{y} = \Delta'' y$	
1′	50	52500	50003	— 2497	— 4,76 %	$\frac{\Sigma + \Delta'' y}{n} = 1{,}93\,\%$
2′	175	57500	50200	— 7300	— 12,69	
3′	300	78900	70900	— 8000	— 10,14	
4′	425	117000	111500	— 5500	— 4,7	
5′	550	161500	161000	— 500	— 0,31	
6′	675	207000	211000	+ 4000	+ 1,93	
7′	800	246300	244000	— 2300	— 0,93	$\frac{\Sigma - \Delta'' y}{n} = 5{,}16\,\%$
8′	925	268700	261700	— 7000	— 2,61	
9′	1050	263000	263000	0	0	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta'' y}{n} = 4{,}23\,\%$	

$$\frac{100}{Ey''} = \frac{1}{2}\left[m \cdot a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\left(a_2^{x} + a_2^{-x}\right)\right].$$

$a_1 = 3{,}8, \qquad a_2 = 10, \qquad m = 1{,}1.$

Mg-Wert* bei 0′ = 5×10000 = 50000.

Ey″ ist mit 10000 zu multiplizieren.

30 % *Bf* (79 % der *Wk*)

Tabelle VIII.

x	R-Werte	Empirische Kurve · y	Berechnete Kurve y'	$\Delta' y = y' - y$	$\frac{100\,\Delta' y}{y} = \Delta' y$	
				P		
1	50	310000	380000	+ 70000	+ 22,58 %	$\frac{\Sigma + \Delta' y}{n} = 14{,}47\%$
1,5	250	1363000	1300000	— 63000	— 4,62	
2	450	1420000	1400000	— 20000	— 1,4	
2,5	650	1010000	1080000	+ 70000	+ 6,36	$\frac{\Sigma - \Delta' y}{n} = 3{,}01\%$
3	850	760000	760000	0	0	
4	1250	1760000	1760000	0	0	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta' y}{n} = 5{,}82\%$	

$Py' = 55\,x^3 - 413\,x^2 + 956\,x - 560.$

Py' = in Zehntausenden.

Tabelle IX.

x	R-Werte	Empirische Kurve y	Berechnete Kurve y'	$\Delta' y = y' - y$	$\frac{100\,\Delta' y}{y} = \Delta' y$	
				P		
2	300	590	400	— 190	— 32,2 %	$\frac{\Sigma + \Delta' y}{n} = 6{,}92\%$
3	350	1000	1000	0	0	
4	400	2100	2460	+ 360	+ 17,1	
5	450	4200	4630	+ 430	+ 10,2	
6	500	6200	6570	+ 370	+ 5,96	$\frac{\Sigma - \Delta' y}{n} = 32{,}2\%$
7	550	8280	8540	+ 260	+ 3,14	
8	600	9900	10000	+ 100	+ 1,01	
9	650	10180	10600	+ 420	+ 4,12	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta' y}{n} = 9{,}22\%$	

$Py' = -5{,}714\,46\,x^3 + 94{,}288\,x^2 - 302{,}873\,3 + 314{,}90.$

Die Werte von Py' sind mit 10 zu multiplizieren.

* Mg = Mikroorganismengehalt.

Optimumgrenzen: 25° Bt

Denitrifizierende Bakterien.

			E			
x	*R*-Werte	Empirische Kurve: y	Berechnete Kurve: y''	$\Delta''y = y'' - y$	$\frac{100\,\Delta''y}{y} = \Delta'y$	
0,3	100	620000	555000	— 65000	— 10,4 %	$\frac{\Sigma + \Delta''y}{n} = 6{,}17\%$
0,4	150	900000	970000	— 70000	+ 7,7	
0,5	200	1200000	1280000	+ 80000	+ 6,66	
0,6	250	1363000	1460000	+ 97000	+ 7,11	$\frac{\Sigma - \Delta''y}{n} = 5{,}89\%$
0,7	300	1453000	1500000	+ 47000	+ 3,23	
0,8	350	1487000	1470000	— 17000	— 1,14	
0,9	400	1470000	1380000	— 90000	— 6,12	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta''y}{n} = 6{,}05\%$	

$$\frac{100}{E\,y''} = \frac{1}{2}\left[m \cdot a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\,(a_2^{x} + a_2^{-x})\right].$$

$a_1 = 2{,}2, \qquad a_2 = 9, \qquad m = 2{,}4.$

$E\,y''$ = in Hunderttausenden.

N-bindende Bakterien

			E			
x	*R*-Werte	Empirische Kurve y	Berechnete Kurve y''	$\Delta''y = y'' - y$	$\frac{100\,\Delta''y}{y} = \Delta''y$	
1	250	500	702	+ 202	+ 40,4 %	
2	307	625	713	+ 88	+ 14,0	
3	364	1250	1760	+ 510	+ 41,6	$\frac{\Sigma + \Delta''y}{n} = 23{,}2\%$
4	421	2880	3650	+ 770	+ 26,9	
5	478	5220	5900	+ 680	+ 13,02	
6	535	7720	8000	+ 280	+ 3,6	$\frac{\Sigma - \Delta''y}{n} = 2{,}13\%$
7	592	9700	9400	— 300	— 3,09	
8	650	10385	10090	— 295	— 2,8	
9	707	10200	10150	— 50	— 0,49	
					$\frac{\Sigma \pm \Delta''y}{n} = 16{,}21\%$	

$$\frac{100}{E\,y''} = \frac{1}{2}\left[m \cdot a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\,(a_2^{x} + a_2^{-x})\right].$$

$a_1 = 3{,}6, \qquad a_2 = 10, \qquad m = 2{,}6.$

Mg-Wert * bei 0' = 700.

und 25 % *Bf.* (60 % der *Wk*). Die Werte von $E\,y''$ sind mit 100 zu multiplizieren.

weitergeführt. Der Umstand, daß die Kurven selbst bei dem niedrigsten Werte von R mit einem Bakteriengehalt von 2,4 Millionen anfangen, beweist uns, wie bereits erwähnt wurde, daß ein großer Teil der Bakterien im Boden sich in Dauerformen, also vorwiegend in Sporenform, vorfindet.

Die Berechnung erfolgte auf Grund von R-Werten, von Bt- und Bf-Zahlen gebildet, die gemäß den bereits ermittelten Gesetzmäßigkeiten innerhalb des Optimumbereiches von 25° Bt und 25% Bf lagen. Es wurden auf den Abb. 12 und 13 auch die R-Werte aufgetragen, die so gebildet wurden, daß wir die Bt um 10 vergrößert haben, um sie später mit den Ergebnissen der Freilandversuche, wo die Werte von Bt, um negative Werte zu vermeiden, mit 10 vergrößert werden, vergleichen zu können.

Die Kurve der Bodenpilze
(Abb. 13 und Tabelle V).

Bei der Darstellung der Pilzkurve soll gleich vorausgeschickt werden, daß, wie anfangs erwähnt wurde, die Optimumgrenzen dieser

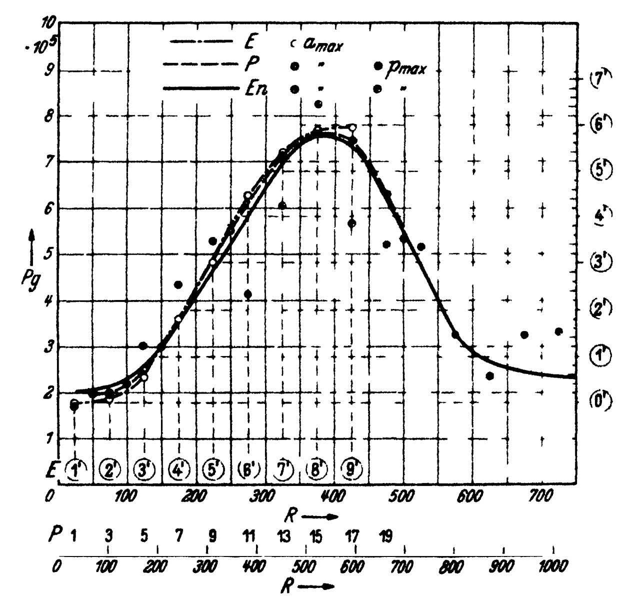


Abb. 13. Die Kurve des Pilzgehaltes. Pg = Pilzgehalt, E = Exponentialkurve; P Parabelkurve; En = eingelegte Kurve; a max = Ante-Maximum, p max = Post-Maximum, R-Werte, oben: Bodenfeuchtigkeit × Bodentemperatur, R-Werte, unten Bodenfeuchtigkeit × (Bodentemperatur − 10).

Mikroorganismen ganz anders liegen wie die der Bodenbakterien. Ihre Temperaturgrenze ist die gleiche, die optimale Bf-Grenze liegt aber bei 15% Bf. Da aber diese Mikroorganismen vorwiegend

aerober Natur sind, so vertragen sie keine so großen Feuchtigkeitsgrade wie die Bodenbakterien, zwischen denen sehr viele fakultativ anaerobe Bakterien zu finden sind. Die Darstellung des Kurvenverlaufs erfolgt auf die gleiche Weise wie bei den Bodenbakterien. Die Richtungskonstanten sind bei beiden Gruppen ziemlich ähnlich. Die Lage des Wendepunktes der Parallelkurve liegt bei 60 % der x-Achse, wobei als Einheit der Achsenanteil des Optimumbereiches angenommen wurde. Bei den Bakterien liegt der Wendepunkt unter den gleichen Bedingungen bei 68 %.

Da die Untersuchungsmethodik bei den Bodenpilzen infolge der bekannten Fragmentation der Mycelien mit ansehnlichen Fehlerquellen belastet ist, so müssen wir unsere Ergebnisse im allgemeinen als recht befriedigend betrachten.

Kurve der Bodenalgen, Optimumgrenzen 25° Bt und 25 % Bf
(Abb. 14 und Tabelle VI).

Bei dieser Mikroorganismengruppe müssen wir bei der Auswertung der Ergebnisse die Unzulänglichkeit der Untersuchungsmethodik ganz besonders berücksichtigen. Trotzdem mußten wir nur einen einzigen

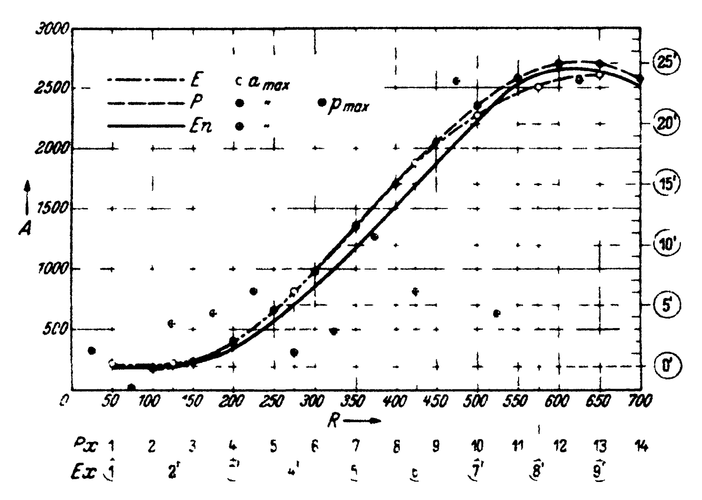


Abb. 14. Die Kurve der Bodenalgen. A = Algenzahl, E = Exponentialkurve; P = Parabelkurve, En = eingelegte Kurve, a max = Ante-Maximum, p max = Post-Maximum, R = Bodenfeuchtigkeit × Bodentemperatur.

Punkt bzw. nur einen einzigen der R-Werte infolge der großen Streuung bei der Berechnung der eingelegten Kurve ausschalten. Im übrigen können wir auch hier von einer guten Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse sprechen. Die Konstanten der Kurve, besonders die der Exponentialgleichung, weichen natürlich von denen der Boden-

bakterien und der Bodenpilze stark ab. Dies gilt besonders für den Wert von m. Der Wendepunkt liegt bei 56 % der x-Achse des Optimumbereiches.

Kurven der physiologischen Bakteriengruppen.

Wir haben auch versucht, den Kurvenverlauf der verschiedenen physiologischen Bakteriengruppen auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse darzustellen, müssen aber bemerken, daß für diese Bakteriengruppen eine exakte Darstellung vorläufig noch nicht ohne weiteres

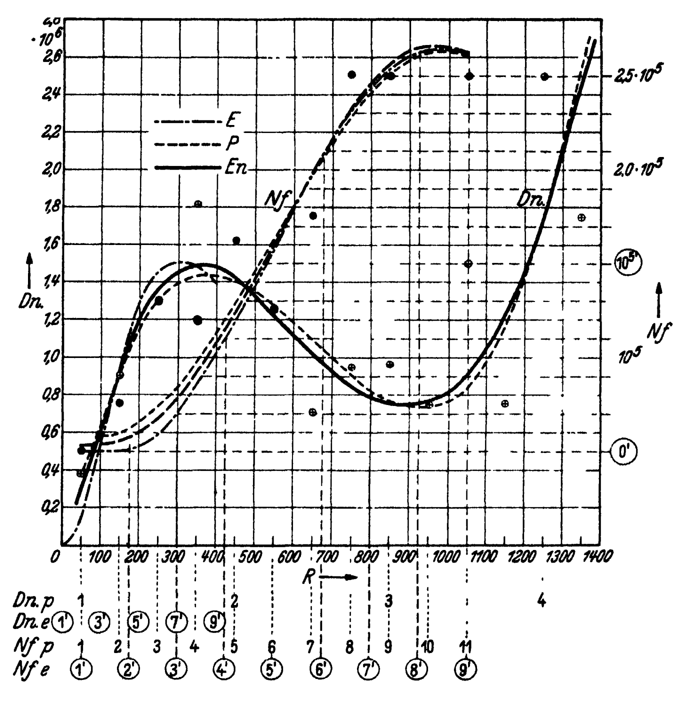


Abb. 15. Die Kurven der nitrifizierenden (Nf) und denitrifizierenden (Dn) Bakterien. E = Exponentialkurve; P = Parabelkurve; En = Eingelegte Kurve; R = Bodenfeuchtigkeit × Bodentemperatur.

möglich ist. Die einzelnen Stufen der Verdünnungen sind nämlich bei den nitrifizierenden und stickstoffbindenden Bakterien durch recht große Intervalle getrennt, die durch Einschaltung von Zwischenstufen nicht hinreichend verbunden werden können. Aus dem Grunde ist daher die mathematisch-analytische Behandlung vorläufig noch mit gewissen Schwierigkeiten verbunden.

Wir besprechen zunächst die Kurve der *nitrifizierenden und denitrifizierenden Bakterien* (siehe Abb. 15 und Tabellen VII und VIII). Da die antagonistische Natur dieser beiden Gruppen von Mikroorga-

nismen uns auf Grund der früheren Untersuchungen bekannt war, so haben wir diesmal bei diesen Mikroorganismengruppen den Verlauf ihrer Kurven vergleichend dargestellt. Die Abbildung beweist recht eindringlich, daß diese Mikroorganismengruppen auch in der analytischen Darstellung ihr antagonistisches Verhalten merklich zum Ausdruck bringen. Die nitrifizierenden Bakterien haben ein ausgesprochenes Optimumgebiet. Ihre Grenzen liegen nach unseren Versuchen und bei der von uns angewendeten Bodengattung bei 35° C und 30 % Bodenfeuchtigkeit. Der Verlauf ihrer Kurve konnte am zweckmäßigsten

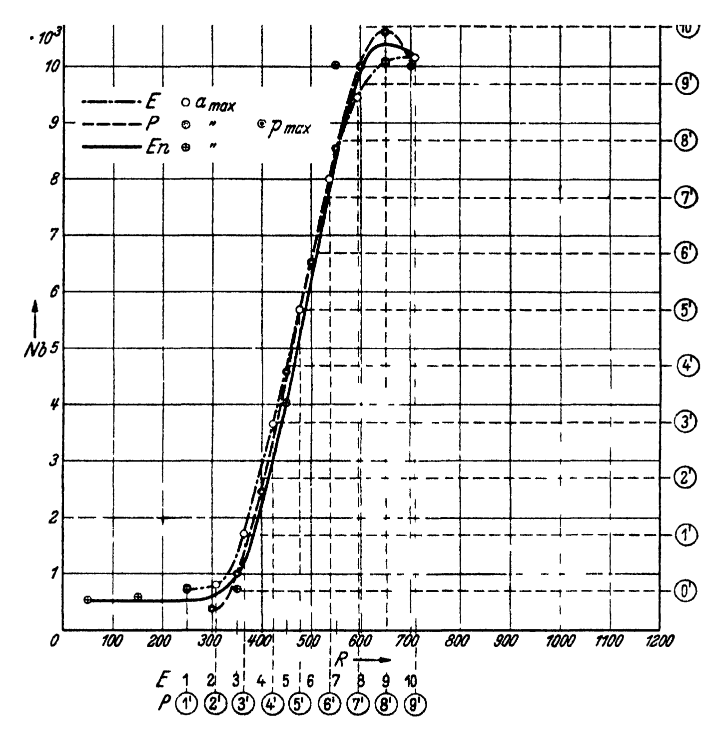


Abb. 16. Die Kurve der stickstoffbindenden (Nb) Bakterien. E = Exponentialkurve, in unteren Reihen Parabelkurve; P – Parabelkurve, in unteren Reihen Exponentialkurve, En = eingelegte Kurve; a max = Ante-Maximum; p max = Post-Maximum, R – Bodentemperatur × Bodenfeuchtigkeit

durch eine Parabelgleichung dritter Ordnung ausgedrückt und dargestellt werden. Den aufsteigenden Ast haben wir auch durch eine Exponentialgleichung charakterisieren können. Dasselbe wie für die nitrifizierenden gilt auch für die denitrifizierenden Bakterien.

Die *Kurve der stickstoffbindenden Bakterien* (siehe Abb. 6 und Tabelle IX). Das Aufsteigen der Kurve erfolgt erst bei den R-Werten zwischen 200 bis 300. Die übrigen Werte liegen an einer Geraden, die

beinahe parallel mit der x-Achse verläuft. Dementsprechend konnten wir die Parabelgleichung und die Exponentialgleichung nur für einen Bereich der *R*-Werte verwenden, der zwischen 250 und 700 liegt. Der Wendepunkt befindet sich bei 61 % der x-Achse des Optimalbereiches (Optimumgrenzen 25° *Bt* und 25 % *Bf*).

Die Untersuchungsergebnisse bei den cellulosezersetzenden Bakterien waren für die mathematische Behandlung nicht geeignet. Ein weiterer Fortschritt auf diesem Gebiete könnte nur durch den weiteren Ausbau und durch die Verfeinerung der Untersuchungsmethoden erzielt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Der Zweck der vorliegenden Untersuchungen war, die exakten und quantitativen Grundlagen der Einwirkung der Bodentemperatur (*Bt*) und Bodenfeuchtigkeit (*Bf*) auf die Lebenstätigkeit der pflanzlichen Mikroorganismen des Bodens, Bodenbakterien, mikroskopische Bodenpilze und Bodenalgen zu erfassen. Sie haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Die Bodentemperatur und der Wassergehalt des Bodens sind untrennbare und sich auch im gegenseitigen Sinne beeinflussende komplexe Biofaktoren des Bodenlebens, deren Wirkung am besten durch ein Produkt charakterisiert werden kann, das durch Multiplikation der numerischen Werte der beiden Komponenten gebildet wird. Dieses Produkt bezeichnen wir als den Faktoren komplex „*R*".

2. Dieser Faktorenkomplex ist ein im mathematischen und analytischen Sinne streng begrenzter Begriff, dessen Lage im Raumkoordinatensystem durch die Schnittpunkte der x- und y- bzw. der *Bt*- und *Bf*-Koordinaten bestimmt wird.

3. Die den einzelnen *R*-Werten zugehörenden Mikroorganismenzahlen (*Mg*) werden dementsprechend in dem Raumkoordinatensystem durch die Schnittpunkte der Raumkurven der zu den einzelnen *Bt*- und *Bf*-Werten gehörenden *Mg*-Zahlen derart bestimmt, daß sie auch räumlich mit den in Punkt 2 besprochenen *R*-Werten korrespondieren.

4. Die verschiedenen Gruppen der pflanzlichen Mikroorganismen des Bodens besitzen ihre optimalen *Bt*- und *Bf*- bzw. *R*-Grenzen, bei denen sie ihre höchste quantitative Entwicklung erreichen. Diese *Bt*- und *Bf*-Zahlen und die zugehörigen *Mg*-Werte stellen die Kardinalwerte der Lebenstätigkeit der Bodenmikroorganismen dar.

5. Der Weg der Kurve, die die zu dem niedrigsten *R*-Wert gehörende *Mg*-Zahl mit dem höchsten *Mg*-Wert verbindet, wird durch solche *R*-Werte bestimmt, die ausschließlich aus *Bt*- und *Bf*-Zahlen gebildet werden, die auf oder innerhalb der Optimumgrenze liegen. Verlauf und Lage dieser Kurve ist daher mathematisch und analytisch ebenfalls

unzweideutig festgelegt. Diese Kurve bezeichnen wir als die optimale Kurve der Lebenstätigkeit der Mikroorganismen.

6. Der absteigende Ast der Kurve, die über das Optimum zu dem niedrigsten Mg-Wert führt, wird durch *R*-Werte bestimmt, die ausschließlich durch überoptimale *Bt*- und *Bf*-Werte gebildet werden.

7. Der physiologische Wirkungswert des *R*-Faktors ist von der hemmenden oder fördernden Natur seiner Komponenten abhängig. *R*-Werte gleicher numerischer Höhe sind also physiologisch nicht gleichwertig. Ihre physiologische Wirkungsweise wird von der Lage abhängen, die ihre Komponenten im Verhältnis zu den Optimumgrenzen der betreffenden Mikroorganismengruppe einnehmen.

8. Die Optimumkurven der verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen können auch im ebenen Koordinatensystem dargestellt und berechnet werden. Man kann sie als Parabelfunktion nach der allgemeinen Gleichung $y = Ax^3 + Bx^2 + Cx + D$ bzw. $Mg = AR^3 + BR^2 + CR + D$ oder als Exponentialgleichungen.

$$\frac{100}{y} = \frac{1}{2}\left[m a_1^{1/x} + \frac{m}{2}\left(a_2^x + a_2^{-x}\right)\right]$$

bzw.

$$\frac{100}{Mg} = \frac{1}{2}\left[m a_1^{1/R} + \frac{m}{2}\left(a^R + a_2^{-R}\right)\right]$$

darstellen und berechnen.

9. Es wurden auch die Optimumgrenzen von *Bt* und *Bf* der verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen ermittelt. Der Faktor *Bf* erwies sich als abhangig von den Werten der Wasserkapazitat der verschiedenen Bodengattungen. Ihre Optimumgrenze liegt ungefähr bei 66 % der maximalen Wasserkapazitat. Die Optimumgrenze der *Bt* liegt ungefähr bei 25° C. Bezüglich der Einzelheiten verweisen wir auf die Tabellen unserer Arbeit (S. 276—281).

Literatur.

1) *D. Fehér*, Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin, Jul. Springer, 1933 (hier die ausführliche Literaturliste). — 2) *Derselbe*, diese Zeitschr. **4**, 447, 1933; 2b) *D. Fehér* u. *M. Frank*, ebenda **8**, 27, 1937. — 3) *D. Fehér*, ebenda **5**, 433, 1934. — 4) *Ch. Killian* u. *D. Fehér*, Ann. Inst. Pasteur. **55**, 573, 1936. — 5) *D. Fehér* u. *M. Frank*, diese Zeitschr. **7**, 1, 1936. — 6) Siehe noch: *A. Rippel*, Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen. Freising-München, F. P. Datterer, 1925; *Janisch*, Das Exponentialgesetz als Grundlage einer vergleichenden Biologie. Berlin, Jul. Springer, 1927; *K. Boresch*, Ergebn. d. Biol. **4**, 130, 1928; *E. A. Mitscherlich*, Schriften der Königsberger Gelehrten-Gesellschaft **10**, 200, 1934. — 7) *A. Itano* u. *J. Tsugi*, Berichte des Ohara Institutes für landwirtschaftliche Forschungen **7**, 407, 1936. 8) *E. Sekera*, Zeitschr. f. Pflanzenern., Düng. u. Bodenkde. **22**, 87, 1931.

(From the Imperial Fisheries Experimental Station Tokyo, Japan.)

Biological studies on the organisms of coli-group isolated from the intestines of oysters.

By

Eiichi Tanikawa.

With one figure in the text.

(Eingegangen am 19. Mai 1937.)

Raw oysters were consumed from very early times in Japan, and the people learned to enjoy the taste of this shellfish. Recently its high nutritive value has been proved by many investigators, and the demand for this shellfish well increases. Besides the home market, oysters in refrigerated form, find an active market in America and Europe.

Nevertheless the consumption of this shellfish in raw stage has not increased proportionally to the increase of production. One of the causes is the remarkable progresses in their culture, particularly the success of the "Hanging Method" of oyster culture, which aims at utilizing the cubical spaces of the sea and increases the amount of production of this shell enormously. But we must mention as one of chief causes the prejudice of the consuming public that oysters are always the carriers of *typhoid germ*. (Scientists know that oysters do carry the typhoid germ in rare circumstances only.)

Hence if this prejudice is not broken by proving the independence of the *typhoid germ* and oysters decisively by bacteriological study, success of the oyster culturing industry can not be expected. Here the author investigated this problem in two stages. Firstly he isolated the organisms from the intestines of those oysters, which were cultivated in these parts of the sea where contamination with the organisms of *coli group* of human origin was not possibl. Secondly he studied the relationship between the organisms of *coli group* of oyster origin and human origin and compared them in their features.

Herdmann and *Boyce* (1), *Smith* (2), *Cumming* (3) and *Toyama* (4) have made the bacteriological study of oysters. Among the pathogenic organisms they have dealt with only the *typhoid bacillus*.

A study of the pathogenic organisms of the human intestines, that are often met with those of the intestines of oysters, may prevent the use of oysters in raw condition. But if the pathogenic organisms found in the intestines of oysters are neither the normal inhabitants of the human intestines nor the causative germs of human diseases, the presence of these organisms can be safely overlooked. The pathogenic organisms of the human intestines have been studied, on several occasions, by several men from the

feces, but the study of pathogenic organisms contained in the feces of other animals is regretfully seaace.

Yamaguchi (5) in his study on the organisms of the fecal origin used the common domestic animals and birds for the warm blooded animals, and fish for the cold blooded animals. Then he made a comparative investigation of the organisms from these animals with the *coli group* organisms of the human origin.

Tsuchida (6) worked out the agglutination reaction by acid and blood serum of the organisms of *coli group* that has been isolated from fish. *Fukuda* (7) classified the organisms of *coli group* that are usually found in the intestines of several kinds of fish. *Darling* (8, 9) studied the fermentation of the carbohydrates by the *coli group* organisms that have been isolated from fish.

Foote (10), *Wood* (11), *Fuller* (12) proved that the organisms that are usually found in the intestines of oysters are those that are commonly found in the sea from which the specimen had been collected. *Houston* (13), *Klein* (14), *Ferguson* (15), *Clark* (16), *Hewlett* (17) affirm that the oysters that are found in the muddy waters do not always carry *coli group* of human origin. But *Geiger, Ward* and *Jacobson* (18) say that out of the 150 strains of the *coli group* of organisms that they were able to identify from the oysters that were purchased from market 8 strains were of human origin. The *coli group* organisms that *Akiba* (19) isolated from oysters resembled more or less to the *coli group* organisms that have been isolated by *Yamaguchi* (5) from fish. The results of *Hindman* and *Goodrich* (20) were similar to that of *Yamaguchi* (5), when they studied the organisms contained in the stomach of the oysters of the Puget Sound region.

Sample and method.

Sample. The three species of oysters (Magaki, *Ostrea gigas Thunberg*; Itabogaki, *Ostrea deselamellosa Lischka*, and Iwagaki, *Ostrea circumpicta Pilsbry*) that are commonly cultivated in Japan were used.

Itabogaki was obtained from the Futami oyster farm of the Imperial Fisheries Experimental Station. Iwagaki was transported from the shores of Shirahama, Chiba Prefecture. Magaki was kindly given to the author by the experimental station at Kanazawa Bay. Itabogaki and Magaki were the products of cultivation by "Hanging Method", while Iwagaki was collected from the natural beds. Every precaution was taken to avoid contamination in the process of removal of the shells from beds. The oysters were carefully collected, packed in clean sterilized parchment papers and sent to the central laboratory at Tokyo as quickly as possible.

Futami farm where Itabogaki had been collected is situated nearly five miles off from the Futami village. Water of this region is known clean. The depth of the sea at that place is 12 to 13 fathoms deep with sandy bottom. The oysters obtained at Chiba were those that grew on the southern west part of the Chiba Prefecture. The east longitude and the north latitude being 133^0 53′ and 34^0 53′ respectively. The bottom of the ocean was rocky and the oysters examined were that

naturally grew on these rocks. Though the usual depth in which the oysters in this region grow is 5 meters, the shells for the present work had been collected from 2 to 3 meters. The farm from which the oysters at Kanazawa had been obtained was previously examined by *Toyama* who found no organisms of *coli group* of human origin.

Method. The oysters brought to the laboratory were carefully unwrapped with sterilized instruments. Then the shell was disinfected by alcohol, and was gently passed over the bunsen burner without cooking the internal contents and the alcohol burned off. Then with clean sterilized pincettes and other instruments one valve of the oyster was removed.

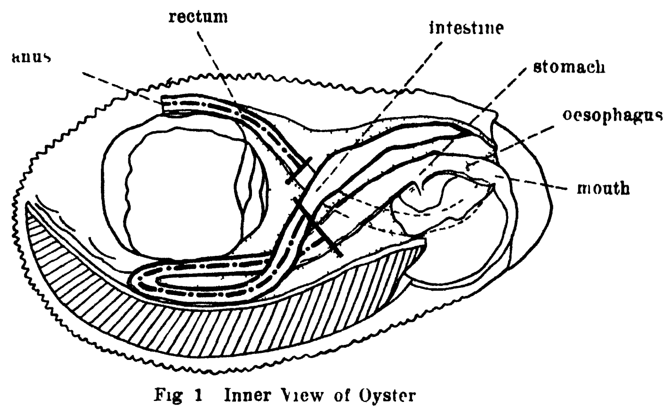


Fig 1 Inner View of Oyster
——— represents cutting line
—·—·— Represents the parts from which intestinal contents were driven out

The slime from the surface of the mantle was transferred on to Endo's agar by sterilized platinium loop [*Round* (21)]. The mantle was removed with sterilized pincettes, dissected with clean instruments, and the contents of anterior part of intestin (see Fig. 1) were removed in sterilized Petri's dishes with sterilized capillary tubes. Lastly from the posterior or anal region intestinal contents were collected in the same way.

Escherich (22) states that the organisms of the *coli group* have the characteristics of moderate long rods, well growth on ordinary media, gram-negative, gelatine-non-liquefaction, moving with particular motion, coagulating the milk media in 1 to 2 days, forming indol and fermenting lactose and glucose into gas and acid.

But the organisms that *Escherich* has mentioned are the one having the typical characteristics of the *coli group.* The author has not limited his object of investigation to the *Escherich*'s typical organisms of the

coli group, but investigated all the organisms which reddened the Endo's media and wera of similar size or of prettily different size.

The isolated bacteria are reserved on agar slant for the study. The ordinary characteristics of the bacteria, for example morphology and biological properties etc., were studied according to the "Manual of the Methods for Pure Culture Study of the Bacteria, Society of American Bacteriologists" (23).

But methylred test and *Voges-Proskauer*'s test (24) were investigated as follows: 5.0 g of potassium phosphate, 5.0 g of pepton, and 5.0 g of glucose were dissolved in 800 ccm of distilled water, then neutralized. The solution was heated for 20 minutes and filtered. The filtrate was cooled to 20° C and the volume of the filtrate was made up to 1000 ccm by adding distilled water. 5.0 ccm of this solution was put into a series of sterile test tubes and sterilized at 100° C for 20 minutes a day for three consecutive days. The media must be surely neutralized, otherwise the cloudy substances deposit to the bottom of the test tube.

After the bacteria are inoculated into several tubes and incubated at 37° C for 3 to 5 days, the media were examined as follows:

1. Methylred test. — Put 5 drops of the methyl red solution (0.1 g of methyl red is dissolved in 300 ccm of alcohol, and the solution is made to 500 ccm with distilled water) into the above inoculated media. If red colour appeared, then methyl red test is positive. If yellow colour appear, then test is negative.

2. *Voges-Proskauer*'s test. — Add 5 ccm of 10 % NaOH solution into the above inoculated media and incubated at 37° C for 24 hours. If eosin red appear, then the *Voges-Proskauer's* test is positive, but otherwise the test is negative.

Many investigators have applied the fermentation reaction of carbohydrates for the classification of the organisms of *coli group*. *Burk* (25) employed dextrose, lactose, galactose, fructose, arabinose, maltose, mannitol, isodulcitol, sucrose, raffinose, dextrin, inulin and glycogen. *Segin* (26) employed lactose, dextrose, erythritol, maltose, dulcitol, galactose, fructose, mannitol and raffinose. *Darling* (8, 9) employed dextrose, lactose, sucrose, inulin, mannitol and salicin. *Kodama* and *Suzuki* (27), *Yamanaka* and *Tan* (28), *Furukawa* (29) employed glycogen, mannitol, sucrose, maltose, lactose, galactose and dextrin.

The author has also employed carbohydrates and polyhydric alcohols as many kinds as possible, and observed the fermentation reaction of the organisms of the *coli group* which were isolated from the intestines of oysters.

The carbohydrates and polyhydric alcohols employed by the author are as follows: 1. Monosaccharides (fructose, dextrose, galactose, man-

nose, xylose, rhamnose). 2. Disaccharides (lactose, sucrose, maltose). 3. Trisaccharides (raffinose). 4. Polysaccharides (glycogen). 5. Trivalent alcohol (glycerin). 6. Quadrivalent alcohol (erythritol). 7. Hexavalent alcohol (dulcitol).

The media containing carbohydrates and polyhydric alcohols were made as follows: The pepton solution containing one of above mentioned carbohydrates and polyhydric alcohols is divided into each *Smith*'s tube and sterilized at 100° C for 30 minutes on each of three consecutive days.

One loopful of each culture of isolated bacteria was inoculated into each of those media and incubated at 37° C for 24 hours. After incubating the media, the production of gas was observed. The reaction of the media was determined after allowing to stand the inoculated media for a week.

Experimental results.

In the above experiments, 337 strains of the organisms which reddened Endo's media were obtained from 229 pieces of shellfish. Among those organisms 5 strains were *colour-producing bacteria*, 32 strains were *Streptococcus* and *Staphylococcus* and 37 strains were *spore forming bacteria* These bacteria which are far different from the *coli group* organisms have been omitted. The rest of all the isolated bacteria, 263 strains, were the bacteria which belong to the *coli group*. Those bacteria were classified into the following 16 groups by their characteristics of colonies on the Endo's media and by the size of vegetative cells.

Table I. The groups of isolated bacteria

Group No.	Number of strains	Size of vegetative cells	The appearence of the colonies on the Endo s media	
C I	54	Moderate long rod	Pink large circular colonies, deep red in center	A
C II	22	„ rod	Red moderate circular colonies	
C III	5	„ long rod	Light red moderate circular colonies	
C IV	12	„ „ „	„ „ large „ „	
C V	9	„ „ „	Red moderate large „ „	
C VI	17	„ „ „	Light red „ „ „	B
C VII	5	„ „ „	Red large „ „	
C VIII	13	„ long	Deep red moderate „ „	C
F I	44	„ „ rod	„ „ „ „ „	A
F II	24	„ „ „	Light „ large „ „	
F III	4	„ short „	Deep „ small „ „	
F IV	20	„ long „	„ „ large „ „	
F V	9	„ „ „	Light „ „ „ „	
F VI	13	„ „ „	„ „ „ „ „	B
F VII	3	„ „ „	Red dotted colonies	
F VIII	9	„ short „	Red moderate „ „	C

In the above table I the groups of C I to C VIII were isolated from the oysters which were collected at Chiba Prefecture (natural growth),

the groups of F I to F VIII were isolated from the oysters which were collected at Futami farm and Kanazawa farm (cultured oysters).

The full characteristics of those groups of bacteria were described below.

Studies on the isolated bacteria.

Description of the groups of isolated bacteria.

1. Group C I.

Rods: 0.5 to 0,6 by 1.0 to 2.0 μ, occurring singly. Actively motile, possessing peritrichous flagella. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, with white yellowish center, rough, slowly liquefied. — *Gelatine stab*: Napiform liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish-white, raised, rough, moist, homogeneous. — *Agar slant*: White to yellowish-white, moist, spreading, rough. — *Broth*: Turbid, with white sediment, produced H_2S gas. — *Litmus milk*: Rapidly acid with coagulation and peptonized. — *Potato*: Abundant, yellowish-brown to greyish-brown, spreading. — *Acid and gas* are formed in dextrose, lactose, maltose, mannose. Acid only in sucrose, galactose, fructose, mannitol, glycogen. No acid or gas is formed in xylose, rhamnose, raffinose, dulcitol, erythrytol. — *Indol* is slowly formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is positive. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°--28° C.

2. Group C II.

Rods: 0.4 to 0.6 by 1.5 μ, occurring singly, and in pairs. Motile with two to four polar flagella. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, bluish-white, raised a little, rough, slowly liquefied. *Gelatine stab*: Napiform liquefaction. --- *Agar colonies*: White, circular, raised, with yellowish white center.— *Agar slant*: Thin, spreading. — *Broth*: Turbid markedly, with a thin pellicle. H_2S gas is formed. — *Litmus milk*: Acid, coagulated, peptonized. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose, sucrose, maltose, glycerol, glycogen, fructose, mannitol. No acid is formed in dulcitol, raffinose, erythritol, xylose, rhamnose. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is not formed. —*Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

3. Group C III.

Rods: 0.6 by 1.0 to 1.8 μ occurring singly and in pairs. Motile, with peritrichous flagella. Gram-negative. --- *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, raised, rapidly liquefied. — *Gelatine stab*: Liquefaction. — *Agar colonies*: Whitish-yellow, raised, moist, rough. - - *Agar slant*: Thin, whitish, spreading. --- *Broth*: Turbid. H_2S is not formed. — *Litmus milk*: Acid, coagulated. — *Potato*: Yellowish brown, moist. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose (with gas), sucrose, maltose, mannose, fructose, raffinose (with gas), galactose, mannitol, glycerol. No acid is formed in glycogen, xylose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is formed. --- *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

4. Group C IV.

Rods: 0.5 to 0.8 by 1.0 to 1.7 μ, occurring singly, and in pairs. Motile, with peritrichous flagella. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine olonies*: Circular, with yellowish center. Liquefaction. — *Gelatine stab*:

Napiform liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish-white, moist, raised, rough. — *Agar slant*: White to yellowish white, moist, spreading. — *Broth*: Turbid, with sediment. H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid formation and coagulation. — *Potato*: Scanty. — *Acid* is formed in dextrose, lactose, sucrose, maltose, mannose (with gas), fructose, galactose, mannitol. No acid is formed in dulcitol, glycogen, raffinose, xylose, rhamnose, glycerol, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is positive. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25⁰—28⁰ C.

5. Group C V.

Rods: 0.5 by 1.0 to 1.5 μ, occurring singly and in pairs. Actively motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, raised, rough, homogeneous, liquefied. — *Gelatine stab*: Napiform liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish white, circular, moist, raised, glistening, entire. — *Agar slant*: Thick, moist, spreading. — *Broth*: Turbid, H_2S is not formed. — *Litmus milk*: Slightly acid, coagulation and peptonization. — *Potato*: Grows. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose, sucrose (with gas), maltose, glycerol, glycogen, mannose (with gas), fructose (with gas), galactose, mannitol, dulcitol and xylose. No acid is formed in rhamnose, erythritol. — *Indol* is formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is not formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is positive. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25⁰—28⁰ C.

6. Group C VI.

Rods: 0.6 to 0.7 by 1.1 to 2.0 μ, occurring singly. Motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, rapidly liquefied. — *Gelatine stab*: Rapid, stratiform liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish white, moist, smooth, entire, raised, homogeneous. — *Agar slant*: Yellowish white, moist, spreading. — *Broth*: Turbid, with white sediment. H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid formation, coagulation and peptonization. — *Potato*: Abundant, the medium becomes brown. — *Acid* is formed in dextrose, lactose, maltose (with gas), mannose (with gas), fructose, galactose, dulcitol, glycogen, raffinose, xylose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25⁰—28⁰ C.

7. Group C VII.

Rods: 0.6 to 0.8 by 1.2 to 1.5 μ, occurring singly. Actively motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, with yellowish center, spreading, liquefied. — *Gelatine stab*: Napiform liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish white circular with yellowish center, raised, moist, rough, homogeneous. — *Agar slant*: Thick, moist, spreading. — *Broth*: Turbid, with white sediment. H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid formation, coagulation and peptonization. — *Potato*: Abundant. — *Acid* is formed in dextrose, lactose (with gas), maltose, glycogen, mannose, fructose, galactose, mannitol, glycerol, xylose. No acid is formed in sucrose, dulcitol, rhamnose, raffinose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is not formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25⁰—28⁰ C.

8. Group C VIII.

Rods: 0.4 to 0.5 by 1.0 to 1.6 μ, occurring singly. Non-motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Thick greenish-white, circular, opaque, moist, entire, non-liquefaction. — *Gelatine stab*: Thick, spreading,

white, opaque. — *Agar colonies*: Greenish white, surface growth, circular, raised, moist, entire. — *Agar slant*: Thick greenish white, moist, glistening, raised. — *Broth*: Turbid, with an abundant sediment. H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid formation and coagulation. — *Potato*: Thick greenish brown, spreading. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose (with gas), sucrose, maltose (with gas), galactose, fructose, mannose, glycogen, mannitol, raffinose, glycerol. No acid is formed in dulcitol, xylose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 30° C.

9. Group F I.

Rods: 0.5 to 0.7 by 1.1 to 1.3 μ, occurring singly. Actively motile possessing peritrichous flagella. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Yellowish white circular, with yellowish center, rough, liquefied. — *Gelatine stab*: Liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish white, raised, rough, moist, homogeneous. — *Agar slant*: White, moist, spreading, rough. — *Broth*: Turbid, H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid formation with coagulation and peptonization. — *Potato*: Abundant, spreading. — *Acid and gas* are formed in dextrose, lactose, sucrose, mannose, acid only formed in maltose, fructose, mannitol, glycerol and glycogen. No acid is formed in dulcitol, raffinose, xylose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is positive. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

10. Group F II.

Rods: 0.5 to 0.6 by 1.2 to 1.5 μ, occurring singly. Actively motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Large bluish white, rough, moist, liquefaction. — *Gelatine stab*: Crateriform liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish white, raised, moist, thick homogeneous. — *Agar slant*: Thick, grassy, spreading. — *Broth*: Turbid, H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid, coagulated and peptonized. — *Potato*: Abundant, yellowish brown, moist. — *Acid* is formed in dextrose, lactose, sucrose, maltose, glycogen, mannose (with gas), fructose, galactose (with gas), mannitol (with gas). No acid is formed in dulcitol, raffinose, xylose, rhamnose, glycerol, erythritol. — *Indol* is formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is not formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

11. Group F III.

Rods: 0.4 to 0.6 by 1.2 to 1.4 μ, occurring singly. Motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Small, circular, gray, stipped, liquefied. — *Gelatine stab*: Crateriform liquefaction. — *Agar colonies*: Whitish, small, slightly raised, moist. — *Agar slant*: Thin, whitish, spreading. — *Broth*: Turbid, with sediment, H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid, coagulated, peptonized. — *Potato*: Grows. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose, sucrose (with gas), mannose (with gas), maltose (with gas), fructose, galactose, mannitol, glycerol, dulcitol, raffinose. No acid is formed in glycogen, xylose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is not formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

12. Group F IV.

Rods: 0.5 to 0.6 by 1.0 to 1.8 μ, occurring singly and in pairs. Actively motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Bluish white,

circular, slightly raised, rough, liquefied. — *Gelatinestab*: Crateriform liquefaction. — *Agar colonies*: Light yellowish white, circular, with yellowish center, rough, small dotted. — *Agar slant*: Moist, spreading, rough. — *Broth*: Turbid, H_2S is formed. – *Litmus milk*: Acid, coagulated. – *Potato*: Yellowish brown, creasy, slightly raised. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose, sucrose, maltose (with gas), mannose, fructose, galactose, mannitol, glycerol, rhamnose. No acid is formed in dulcitol, glycogen, raffinose, xylose, erythritol. — *Indol* is formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is positive. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

13. Group F V.

Rods: 0.5 to 0.7 by 1.4 μ, occurring singly. Motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, flat, whitish to bluish, rough. — *Gelatine stab*: Slowly, stratiform liquefaction. — *Agar colonies*: Circular, or irregular, moist, raised, slightly, rough. — *Agar slant*: Bluish white, smooth, glistening. – *Broth*: Turbid, with sediment. H_2S is formed. – *Litmus milk*: Acid with coagulation. — *Potato*: Abundant, dirty white growth. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose, sucrose (with gas), mannitol, maltose (with gas), mannose, fructose, glycerol. No acid is formed in dulcitol, glycogen, raffinose, galactose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is positive. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

14. Group F VI.

Rods: 0.7 to 0.9 by 1.2 to 2.0 μ, occurring singly and in pairs. Motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Circular, bluish white, granular, liquefied. — *Gelatine stab*: Crateriform liquefaction. — *Agar colonies*: Thick, circular, yellowish white, raised, granular, moist. — *Agar slant*: Thick, spreading, rough. — *Broth*: Turbid rapidly, with sediment. H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid, coagulated, not peptonized. — *Potato*: Grows. — *Acid* is formed in dextrose, lactose, mannose (with gas), fructose, galactose, mannitol, glycerol. No acid is formed in sucrose, maltose, dulcitol, glycogen, raffinose, xylose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

15. Group F VII.

Rods: 0.4 to 0.5 by 1.0 to 1.5 μ, occurring singly. Slightly motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Small, circular, gray, stipped, liquefied. — *Gelatine stab*: Crateriform liquefaction. — *Agar colonies*: Yellowish white, moist, small circular, entire. — *Agar slant*: Yellowish white, moist. — *Broth*: Turbid, with sediment. — *Litmus milk*: Acid, with coagulation. — *Pōtato*: Grows well. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), lactose, maltose (with gas), mannose (with gas), fructose, galactose, glycerol, xylose. No acid is formed in sucrose, dulcitol, glycogen, raffinose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is not reduced. — *Ammonia* is not formed. — *Voges-Proskauer's test* is negative. — *Methyl red test* is positive. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 25°—28° C.

16. Group F VIII.

Rods: 0.6 to 0.7 by 1.0 to 1.8 μ, occurring singly and in pairs. Slightly motile. Gram-negative. — *Spore*: None. — *Gelatine colonies*: Bluish-white,

circular, opaque, moist, entire, slightly raised. No liquefaction. — *Gelatine stab*: Thick, spreading, opaque. — *Agar colonies*: Grayish white, circular, faintly shining, smooth, entire. — *Agar slant*: Thick, faintly shining, spreading. — *Broth*: Turbid, with slight sediment. — H_2S is formed. — *Litmus milk*: Acid, with coagulation. No peptonization. — *Potato*: Yellowish brown, slightly raised, moist. — *Acid* is formed in dextrose (with gas), galactose, lactose (with gas), sucrose, maltose (with gas), mannose, fructose (with gas), mannitol, glycerol, raffinose. No acid is formed in dulcitol, glycogen, xylose, rhamnose, erythritol. — *Indol* is not formed. — *Nitrate* is reduced to nitrite. — *Ammonia* is formed. — *Voges-Proskauer's test* is positive. — *Methyl red test* is negative. — *Aerobic*, facultative. — *Opt. temp.*: 30° C.

General considerations for the characteristics of the groups of the isolated bacteria.

1. Morphology. It seems that the organisms of *coli group* which were isolated from the intestines of the oysters are smaller in size than those belonging to the *coli group* of the human origin. Of course, this difference is not decisive to classify the both. But in the case of the organisms of the *coli group* which were isolated from the intestines of oysters, the colonies on the agar plate are generally circular, the surroundings of the colonies are light colour and the centers of the colonies are deep yellowish white. On the other hand on the Endo's media, the surroundings of the colonies are light red, and the centers are deep red. It seems that these points are important in the classification of the organisms of *coli group* of human origin and those of oysters.

2. Gram-staining. All the bacteria are negative.

3. Spore-forming. All the bacteria are non-spore former.

4. Gelatine liquefaction. The most of the organisms of the *coli group* which were isolated from the intestines of oysters are able to liquefy the gelatine media. But 22 strains out of the isolated bacteria which seemed to be *B. aerogenes* do not liquefy the gelatine media.

The liquefaction of the gelatine media by the majority of the organisms of *coli group* which were isolated from the intestines of fish has been stated by *Yamaguchi* (5) and *Darling* (9) as a peculiarity.

5. Motility. The majority of the organisms of *coli group* which were isolated from the intestines of the oysters are in more active motion than those of human origin. But the organisms which seemed to be *B. aerogenes* are non motile or slightly motive.

6. Milk media. The majority of the organisms of *coli group* which were isolated from the intestines of the oysters change the milk media into acid reaction, and coagulate them. The coagulation of milk is made almost all in 3 days at 28° C, though the velocities of the coagulation are different by different species. The peptonization of milk is made by bacteria of some strains.

7. Indol-formation. The test of indol formation was made by the *Ehrlich-Bohme*'s method in the "Manual of methods for pure culture study of bacteria". When the test was made after 5 days incubation, formation of indol was not observed in the majority of the cultures, but after 2 weeks indol was detected in 40 % of the total cultures.

8. Nitrate reduction. A half of bacteria of the total strains reduce the potassium nitrate to potassium nitrite. The test for nitrate reduction was carried out by the methods described in the *Eyre*'s Bacteriological Technique (30) and *Takeuchi*'s Bacteriology and Immunology (31).

9. Ammonia production. A half of bacteria of the total strains produce ammonia. For the test of the production of ammonia, the saturated borax solution was added to the incubated cultures, then distilled. The distillates were tested by the *Nessler*'s reagent.

10. Voges-Proskauer's test and Methyl red test. Bacteria of 67 strains (about 25 %) out of the total strains are positive for the former test, and bacteria of 101 strains (about 38 %) out of the total strains are positive for the latter.

11. Acid and gas formation in carbohydrates and polyhydric alcohols. The results obtained by the author were as follows (Table II and III).

Table II.

Strain No	dextrose	lactose	sucrose	maltose	galactose	mannose	fructose	mannitol	dulcitol	xylose	raffinose	rhamnose	erythritol	glycerol	glycogen
C I	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	—	—	—	—	—	(+)	(+)
C II	( )	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+
C III	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	—
C IV	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	—	—	—	—	—	—
C V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+
C VI	+	+	—	+	+	[illegible]	+	+	—	—	—	+	—	+	—
C VII	+	(+)	—	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	+	+
C VIII	(+)	(+)	+	(+)	+	+	+	+	—	—	+	—	—	+	+
F I	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	+	—	—	—	—	—	+	+
F II	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	—	—	—	—	—	—	+
F III	(+)	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	+	—	+	—	—	+	—
F IV	(+)	+	+	(+)	+	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—
F V	(+)	+	—	—	+	(+)	+	+	—	—	—	—	—	+	—
F VI	(+)	[illegible]	—	(+)	+	+	+	+	—	+	—	—	—	+	—
F VII	(+)	+	—	(+)	+	+	+	+	—	+	—	—	—	+	—
F VIII	+	(+)	+	(+)	+	+	(+)	+	—	—	—	—	—	—	—

N. B.: (+) represents acid and gas formation, + represents acid formation only, and — represents non-fermentation.

From the above tables, it can be said that the majority of the organisms ferments most of the carbohydrates and polyhydric alcohols

Table III.

	dextrose	lactose	sucrose	maltose	galactose	mannose	fructose	mannitol	dulcitol	xylose	raffinose	rhamnose	erythritol	glycerol	glycogen
Number of strains which fermented carbohydrates and polyhydric alcohols	263	263	225	250	254	263	263	263	18	24	22	34	0	187	171
%	100	100	85	95	95	100	100	100	7	9	8	13	0	71	65

except xylose, rhamnose, raffinose, dulcitol and erythritol. Xylose, rhamnose, raffinose and dulcitol are in very few cases fermented by organisms of certain strains. But erythritol is fermented by none of the strains.

12. Optimum temperature. It is very interesting to know whether the organisms of *coli group* of oysters, cold blooded animal, can grow or not in rather high temperatures in which the organisms of human origin grow. The literature on the optimum temperature of the organisms of *coli group* which were isolated from the intestines of the cold blooded animals are very few as compared with those of the organisms of *coli group* which were isolated from the human beings or other warm blooded animals. According to the report of the *Government of Formosa* (32) the organisms of *coli group* which are isolated from the intestines of cold blooded animals, such as salmon and eel, can be distinguished from those of warm blooded animals by incubating at 46° C. *Yamaguchi* stated the organisms of *coli group* isolated from the intestines of the fish could not grow at 50° C, and its optimum temperature was 22° C.

The organisms of *coli group* isolated by the present author were tested by following method. One loopful of each culture of bacteria was inoculated on the agar slant media. These inoculated media were allowed to stand at 4°—6° C (ice box), 12°—22° C (room temperature), 28° C, 32° C, 36° C, and 45° C, for several days. The growing appearences were observed by the naked eye. After 24 hours, bacteria of the most of the strains were found unable to grow at 45° C, except C VIII and F VIII which showed still slight growth. These two strains seemed to be *B. aerogenes*. After 48 hours, the media which were inoculated by the organisms except C VIII and F VIII, and incubated at 45° C, were removed to the incubator of 28° C. But no growth was any longer observed on those media. The growing appearence at 36° C were distinctly observed to be inferior to the one at 28° C. After 24 hours, all the strains incubated 28° and 32° C, made not difference in their growth, but after 48 hours the growth of the strains incubated at 32° C was

slightly inferior to those incubated at 28° C. One weeks' culture at room temperature and ice box showed the growth nearly equal to the 24 hours' culture at 36° C. However, the growing temperature of the above C VIII and F VIII were as above mentioned different from the other strains, and their optimum temperature was 32° C.

The results obtained from the experiments on the growing appearence at various temperatures were as follows (Table IV).

Table IV.

	4—6° C (ice box)	12—22° C (room temp.)	28° C	32° C	36° C	45° C
Type A und B	++	++	+++	++	++	—
„ C . . .	++	++	++	+++	++	±

(N. B.: +++ represents the abundant growth, ++ represents moderate growth, ± represents slight growth and — represents non growth.)

Nextly the thermal resistance of the bacteria for heat were examined. The bacteria which were isolated from the intestines of the oysters were able to bear at 60° C for 5 minutes, but were sterilized at 80° C for more than one minute.

Identification of the organisms of Coli group which were isolated from the intestines of the oysters.

From the above mentioned characteristics of the bacteria which were isolated from the intestines of the oysters, the author identified them from the organisms of *coli group* of human origin.

Heretofore, the classification of the organisms of *coli group* have been done in the following manner.

1. *Classification by the fermenting reaction of carbohydrates.* This classification has been employed by many investigators as above mentioned and has been said to be possible. But *Furukawa* (29) investigated the fermenting reactions of dextrin, sucrose, dextrose, maltose, lactose, galactose and mannitol for *B. coli* which was isolated from stool, and has reported that it is difficult to identify the organisms of *coli group* by this reaction.

2. *Classification by the agglutination reaction.* There are many investigators who used the agglutination reaction for the classification of the organisms of *coli group.*

Velde (33), *Wolf* (34), *Jatta* (35), *Gyorgy* (36), *Burk* (25), *Geisse* (37), *Rothberger* (38), *Kodama* and *Suzuki* (27), *Yamanaka* and *Tan* (28), *Furukawa* (29), *Adachi* (39), *Aoki* (40), *Yaoi* (41), *Fujiwara* (42), *Yamaguchi* (5) have investigated the agglutination reaction for the classification of the organisms of *coli group*, and have reported to be difficult.

For example, *Burk* said that even the same strains of *B. coli* which were isolated from the feces and allowed to stand on the same cultural conditions, did not show the same agglutination reaction.

3. Classification by complement combination reaction. The classification by complement reaction was rarely employed in comparison with the one by the agglutination reaction. *Altmann* (43) and *Yamaguchi* (5) have investigated this method, and found the classification by this reaction impossible.

Here the author has employed the morphological and biological properties and the fermenting reaction of the organisms for their classification.

The organisms which liquefied the gelatine media were assorted from the other, and were named temporarily C type. The organisms which did not liquefy the gelatine media were divided into two types, A and B by the fermenting reaction for sucrose. The A type was also divided into 5 species, A I, A II, A III, A IV and A V respectively, by the fermenting reactions of dulcitol, xylose, raffinose, rhamnose and the production of indol. The B type was also divided into two species of B I and B II.

The A I among the A type amounted to 98 strains out of the total 263 strains. The organisms of these types seemed to be the representatives of *coli group* which was isolated from the intestines of the oysters.

Akiba (19) has described in his bacteriological studies on the market oysters that the bacteria showing the following characteristics (gelatine-liquefaction, non-spore, gram-negative, fermenting-lactose) are *B. coli* of fish origin which were isolated and identified by *Yamaguchi* (5). *Geiger*, *Winnfred*, *Ward* and *Jacobson* (18) have isolated the organisms of *coli group* which are characterized by gelatine-liquefaction, non-spore, gram-negative and fermenting-lactose, and classified them into from *B. proteus I* to *B. proteus XII* respectively.

The organisms of *coli group* which were isolated from the intestines of the oysters by the present author seemed to be the organisms of *coli group* of fish origin which were described by *Yamaguchi* from their characteristics of rod-shaped, gelatine-liquefaction, non-spore, gram-negative and their properties of fermenting carbohydrates and polyhydric alcohols. The C type resembled to *Aerobacter aerogenes* (*Kruse*) *Beijerinck* which has been described on the *Bergey*'s Manual and also resembled to *B. lactis aerogenes* which was described by *Akiba* or to *B. aerogenes* of *Geiger et al* (18). But the C type differs from the former in the growth on the milk media, and from the latter in the production of indol.

The present author described the C type as *Aerobacter aerogenes* (*Kruse*) *Beijerinck.*

Differences between the organisms of Coli group isolated from the intestines of the oyster and those of human origin.

Between the Coli group of oyster and human origin.

It is important to identify the organisms of *coli group* of oyster origin from those of human origin as above mentioned.

The present author inspected the above characteristics of the organisms of *coli group* which were isolated from the intestines of the oysters and summarized the differences between the both origins, and compared them. The results are as follows.

B. coli communis and *B. coli communior* which were obtained from the Institute of Infectious Diseases, Tokyo, were employed as controls.

1. The colonies of the organisms of *coli group* of oysters origin on the Endo's media are generally light red circular with deep red center.

2. Actively motile.

3. Gelatine-liquefaction.

4. The organisms of *coli group* of oyster origin hardly ferment xylose, rhamnose, raffinose, dulcitol, erythritol, but those of human origin ferment xylose, dulcitol, raffinose, rhamnose.

5. The organisms of *coli group* of oyster origin hardly produce indol, or very slightly if they produce.

6. The optimum temperature of the *coli group* of oyster origin is 25^0-30^0 C, while that of *coli group* of the human origin is 37^0 C.

Examining these characteristics, 3. and 4. seemed fitted to identify the both origins each other. But some of the A and B types of *coli group* isolated from the intestines of the oysters can be scarcely identified by the 3. and 4.

The differences between the Aerobacter aerogenes and the organisms of Coli group of human origin.

Aerobacter aerogenes has the similar characteristics with the *B. coli communis* and *B. coli communior* of *coli group* of human origin.

But *MacConkey* (46, 47), *Rogers*, *Clark* and *Evans* (48), *Clemesha* (49), *Chen Chong Chen* and *Rettger* (50), *Darling* (8, 9) stated that these *Aerobacter aerogenes* are not necessarily found in feces, but rather found frequently at the other places. *Akiba* (19), *Geiger*, *Winnfred*, *Ward* and *Jacobson* (18) also reported that these *Aerobacter aerogenes* were isolated from the oysters.

Therefore, the author does not consider that the presence of these *Aerobacter aerogenes* means the contamination of human feces.

Identification of the *Aerobacter aerogenes* and the *coli group* of human origin each other was studied by *Skinner* and *Murray* (51), *Yamaguchi* (5), and was reported that the former produced no indol,

was negative for methyl red test and positive for the *Voges-Proskauer*'s test, and nearly all strains fermented sucrose and raffinose.

The present author also found that these differences exist between the C type which seemed to be *Aerobacter aerogenes* and the organisms of *coli group* of human origin.

Auto-disinfectious action of the oysters.

For the purpose of obtaining oysters free from the organisms of *coli group* of human origin, the auto-disinfectious action of the oysters are studied by *Toyama* and *Yasukawa* (4) and *Hinard* (52). The higher animals have special intestinal bacteria in their digestive organs. Those bacteria are said to play an important role in digestion of food. [*Schottelius* (53), *Metchnikoff* (55), *Moro* (56).]

From these facts, the author thought that oysters may have also the special intestinal bacteria in their digestive organs, and tried to drive off the other kinds of bacteria if they come into the digestive organs.

If the organisms of *coli group* isolated from the intestines of the oysters are special for the digestive organs of the oysters, these bacteria may remain unwashed in their intestines, by circulating clear water into the digestive organs. If these bacteria are those which have come into the organs temporarily from the other matter, these bacteria may be washed out by circulating of clear water.

Experimental method.

The samples for this experiment were also brought from the Futami Farm as before. 10 shells each of these oysters were put into the clear sea water which has been tested not to be contaminated by the organisms of *coli group* on the Endo's media.

The sea water was changed on each of 7 consecutive days, and every time the old sea water was tested on the Endo's media whether the organisms of *coli group* was excreted from the intestines of the oysters. Proving that the oysters do not excrete organisms of *coli group* of human origin into the surrounding sea water, these oysters were cultured separately in two series of basins, one of which contained a bacterial infusion of organisms of *coli group* isolated from the intestines of oysters and the other contained those of human origin. After 24 hours' contamination in these bacterial infusion, the oysters were washed through their intestines with sea water free from organisms of *coli group*, in order to excrete organisms of *coli group* which are not special to oysters. One of those oysters was taken from each series of the basin and examined for the organisms of *coli group* present in the intestines. These washing and examination were carried out daily for several days.

Experimental results.

The results of auto-disinfectious action of the oysters in the clear sea water are as follows (Table V).

Table V.

Days after inoculated	*B coli communior*	*B. coli communis*	C I	C VI	C VIII	F I	F VII	F VIII
1 day .	+	+	+	+	+	+	+	+
2 days .	+	+	+	+	+	+	+	+
3 " .	+	+	+	+	+	+	+	+
4 . .	+	+	+	+	+	+	+	+
5 " .	+	+	+	+	+	+	+	+
6 " .	—	—	+	+	+	+	+	+
7 " .	—	—	+	+	+	+	+	+

(+ represents the presence of the bacteria, and — the absence.)

It will be seen from the above table that the oysters contaminated with organisms of *coli group* of human origin are free from such organisms after 6 days' washing, while the oysters in the sea water containing the organisms of *coli group* of oyster origin contain the organisms in their intestines.

Consequently, if the organisms of *coli group* of human origin parasite temporarily in the oysters, the organisms which are not special to the oysters are excreted from their intestines in the course of about a week by changing the surrounding sea water at intervals.

Since the type of C VIII and F VIII, namely C type (*Aerobacter aerogenes*) were also proved to be contained a long time in the intestines of the oysters, they also seemed to be one of the special types for the oysters.

Frequently it has been said that the organisms of *coli group* of human origin are found in fresh oysters, but it is considered probably due to the bad handling of the oysters. With respect to this point, *Buice*, *Schested* and *Diennst* (57) reported the very interesting case that when treated badly, 8.38% of fresh foods are found contaminated by the organisms of *coli group* of human origin in the 337 times of examinations.

It is important to treat clearly oysters, in order to prevent the contamination of those organisms.

Summary.

Organisms of *coli group* which were isolated from intestines of oysters taken from clear uncontaminated sea water are studied biologically, particularly on the relation with those of human origin.

1. Organisms of *coli group* isolated from intestines of oysters amounted 16 groups, 263 cultures; they are divided into three species A, B and C types.

2. A and B types are those known as organisms of *coli group* of fish origin, and possess the following characteristics: rod-shaped, gram-negative, non-spore, gelatine-liquefaction, actively-motile, non-fermentation of xylose, rhamnose, dulcitol, raffinose, erythritol, with an optimum temperature from 25° C to 30° C.

3. C type corresponds to *Aerobacter aerogenes* (*Kruse*) *Beijerinck*, but its presence in the intestines of oysters is not considered due to contamination of human feces.

4. Organisms of *coli group* of fish origin differ from those of human origin in the following characteristics: motility; gelatine-liquefaction; fermentation of xylose, raffinose, rhamnose, dulcitol and other carbohydrates and polyhydric alcohols; production of indol; optimum temperature.

5. *Aerobacter aerogenes* isolated from intestines of oysters is identified from organisms of *coli group* of human origin in its being positive for *Voges-Proskauer*'s test.

6. From the result of experiment on auto-disinfectious action of oysters, organisms of *coli group* of oysters origin are not considered to parasite temporarily in the intestines of oysters.

7. It is considered that the frequently alledged presence of organisms of *coli group* of human origin in fresh oysters may due to bad handlings of material.

8. The present author was unable to find human-origin *coli group* from oysters which were cultivated by the "Hanging Method" in clear sea, or cultivated normally in clear sea water, or in those that grow naturally in clear sea.

Literature.

1) *Herdman, W. A.*, and *Boyce, R.*, (1899): cited from The Japanese Journal of Hygiene and Infectious Diseases 24, 418, 1918. — 2) *Smith, Th.* (1904): Ditto. — 3) *Cumming, H. S.*, U. S. Hygienic Lab. Bull. **104**, 1915. — 4) *Toyama, Y.*, Japanese Journal of Infectious Diseases 4, 101, 1928. — 5) *Yamaguchi, S.*, Kokumin Eisei, The National Hygiene **3**, 4, 609, 1926. — 6) *Tsuchida, C.*, Jap. Journ. of Hyg. and Inf. Dis. **25**, 259, 1926. — 7) *Fukuda, T.*, A graduation dissertation at Imp. Fish. Inst. 1927. — 8) *Darling, A.*, American Journal of Public Health **9**, 844, 1919. — 9) *Darling, A.*, Ditto **13**, 822, 1923. — 10) *Foote, C. J. A.*, Med. News **66**, 320, 1895. — 11) *Wood, G. E. C.*, Brit. Med. Journ. **2**, 666, 759, 852, 1896. — 12) *Fuller, C. A.*, U. S. Bureau of Fisheries Rep. **189**, 1904. — 13) *Houston, A. C.*, Royal Sewage Commission 4th. Rep. 220, 1903. — 14) *Klein, E.*, Med. Off. Local Gov. Board of Gr. Brit. Rep., 24 App., **2**, 109, 1874-5. — 15) *Ferguson, R. A.*, Virginia Health Bull. **11**, 1909. — 16) *Clark, W. M.*, Rep. State Board of Health of Mass. 449, 1905. — 17) *Hewlett, R. T.*, Brit. Med. Journ. **1**, 1082, 1903. — 18) *Geiger, J. C.*, *Ward, W. E.*, and *Jacobson, M. A.*, Journ. of Inf. Dis. **38**, 273, 1926. — 19) *Akiba, T.*, Jap. Journ. of Hyg. a. Inf. Dis. **24**, 418, 1928. — 20) *Hindman, E. F.*, and *Goodrich, F. J.*, Am. Food Journ. **12**, 611, 1917. — 21) *Round, L. A.*, Am. Journ. Pub. Health **6**, 686, 841,

1916. — 22) *Escherich, Th.*, Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings, Stuttgart 1886. — 23) Society of American Bacteriologists: Method for Pure Culture Study of Bacteria, 1926. — 24) Standard Method of Water Analysis, 1921. — 25) *Burk, A.*, Centralbl. f. Bakt. I, Orig., **45**, 577, 1908. — 26) *Segin, A.*, Centralbl. f. Bakt. I, Orig., **84**, 206, 1897. — 27) *Kodama, T.*, and *Suzuki, C.*, Jap. Journ. of Hyg. a. Inf. Dis. **11**, 4, 1915. — 28) *Yamanaka, S.*, and *Tan, C.*, Juzen-Kai Zasshi, No. 146, 1918. — 29) *Furukawa, S.*, Saikin-Gaku-Zasshi, Journ. of Bacteriology, No. 258, 277, 1917. – 30) *Eyre, J. W. H.*, Bacteriological Technique, 1916. – 31) *Takeuchi, M.*, Bacteriology and Immunology (Kinsei Saikingaku oyobi Menekigaku), 1930. — 32) Government of Formosa, Report of 15th. Meeting of Association of Water Supply, **118**, 1925. – 33) *Velde, van de*, Bull. de L'Acad. Royal de Med. Belgique 261, 1897. — 34) *Wolf, S.*, Centralbl. f. Bakt. I, **25**, 311, 1899. — 35) *Jatta, M.*, Zeitschr. f. Hyg. **83**, 185, 1900. — 36) *György, P.*, Centralbl. f. Bakt. I, Orig., 84, 321, 1920. — 37) *Geisse, A.*, Centralbl. f. Bakt. I, Orig., **46**, 359, 1908. — 38) *Rothberger, C. J.*, Zeitschr. f. Hyg. **84**, 79, 1900. — 39) *Adachi, K.*, Fukuoka Igaku Zasshi, Journ. of Med. of Fukuoka. **15**, No. 2, 1922. — 40) *Aoki, K.*, Tohoku Igaku Zasshi, J. of Med. of Tohoku. **2**, No. 2, 3, 131, 1921. — 41) *Yaoi. H.*, Jap. Journ. of Hyg. a. Inf. Dis. **20**, 1, 1924. — 42) *Fujiwara, K.*, Kyoto Igaku Zasshi, Journ. of Med. of Kyoto. **18**, No. 1, 9, 1922. — 43) *Altmann, K.*, Centralbl. f. Bakt. I, Orig., **45**, 217, 1908. — 46) *Mac Conkey, A.*, Journ. of Hyg. No. 9, 86, 1905. — 47) *Mac Conkey, A.*, Ditto No. 5, 333, 1909. — 48) *Rogers, L. A.*, *Clark, W. M.*, and *Evans, A. C.*, Journ. of Inf. Dis. **15**, 99, 1914. — 49) *Clemesha, W. W.*, Centralbl. f. Bakt. I, Ref., **56**, 510, 1913. — 50) *Chen, Chong Chen* and *Rettger, L. F.*, Centralbl. f. Bakt. I, Ref., **71**, 557, 1921. — 51) *Skinner, Ch. Edw.*, and *Murray, T. J.*, Centralbl. f. Bakt. I, Ref., **77**, 507, 1924. — 52) *Hinard, G.*, Chem. Abst. **24**, 1, 4100, 1930. — 53) *Schottelius, L. M.*, Arch. f. Hyg. **34**, 210, 1899. — 54) *Schottelius, L. M.*, Ditto **42**, 48, 67, 177, 1902. — 55) *Metchnikoff, E.*, cited from "*Kolle* u. *Wassermann*, Handb. d. Pathog. Mikroorg. **6**, 468—509, 1931". — 56) *Moro, E.*, Münchn. Med. Wochenschr. 2001, **1906**. — 57) *Buice, W. A.*, *Schested, H. C.*, and *Dienst, R. B.*, Journ. of Inf. Dis. **40**, 351, 1927.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Kgl. Universität B. Mussolini, Bari, Italien.)

Über Aktivierung der Coligärung.

Von

L. Califano.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Mai 1937.)

In *Ringer*-Lösung aufgeschwemmte Kulturen von *Bacterium coli* weisen unter anaeroben Bedingungen eine beträchtliche glykolytische Kraft auf. Zentrifugiert man dagegen die Bakteriensuspension und wäscht den Bakterienrückstand noch zwei- bis dreimal durch weiteres Zentrifugieren in *Ringer*-Lösung, so ist die anaerobe Spaltfähigkeit beträchtlich vermindert oder geradezu aufgehoben. Dies laßt vermuten, daß ein zur Spaltung unentbehrlicher Stoff in die Waschflüssigkeit übergeht. In der Tat findet man, daß die Spaltfähigkeit dann wieder erscheint, wenn man der Aufschwemmung von gewaschenen Bakterien Waschflüssigkeit (praktisch bakterienfrei!) zusetzt.

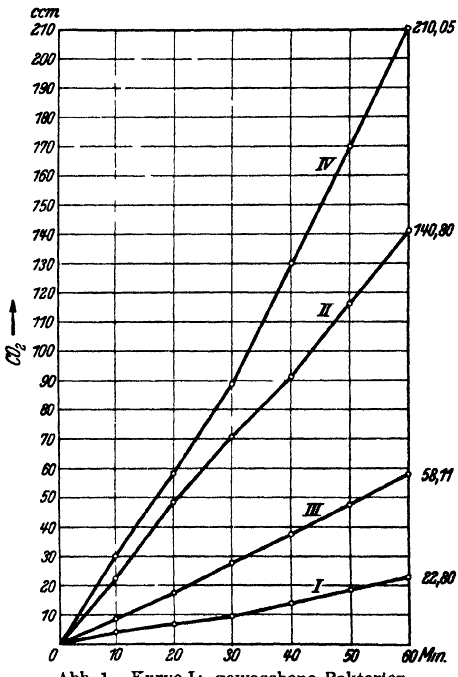


Abb 1 Kurve I: gewaschene Bakterien. Kurve II: dieselben mit Adenylpyrophosphat (Konz. etwa m/300). Kurve III: gewaschene Bakterien. Kurve IV: dieselben mit Adenosin einschl. CO_2-Retention (Konz. m/450).

Daraus ist zu entnehmen, daß die Zuckerspaltung durch die Bakterienzellen, und zwar durch eine ihnen leicht entziehbare, aber für den Spaltungsvorgang unentbehrliche Substanz bewirkt wird.

Verschiedene Stoffe, die bei anderen glykolytischen Reaktionen als Co-Fermente fungieren können, wurden auf ihre Wirksamkeit geprüft, zuerst Adenylpyrophosphorsäure, die sich als guter Aktivator der Gärtätigkeit der *Coli*-Bakterien erwies. Bei Zusatz geringer Mengen zu einer durch Waschen inaktivierten Suspension erhält man das Wiedererscheinen der Spaltfähigkeit, die bei Erhöhung der Zusatzkonzentration bis zu einem Maximum ansteigt, um

dann ohne Rücksicht auf weitere Erhöhung der Zugabe von Adenylpyrophosphat konstant zu bleiben.

Auch Adenylsäure ist ein wirksamer Aktivator der Glykolyse, bei gleicher Konzentration der Adenylpyrophosphorsäure etwas überlegen.

Noch besser wirkt Adenosin; seine Aktivierungskraft ist etwa doppelt so groß wie die der beiden anderen Verbindungen.

Als noch weit aktiver stellen sich jedoch Glutathion und Cystein heraus. Zusatz kleinster Mengen läßt die inaktiv gemachten Keime eine etwa zehnmal so große Spaltstärke erreichen wie mit Adenylpyrophosphorsäure. Cystein und Glutathion sind einander gleichwertig, da das letztgenannte nur durch seinen Cysteinanteil wirksam ist; Zusatz

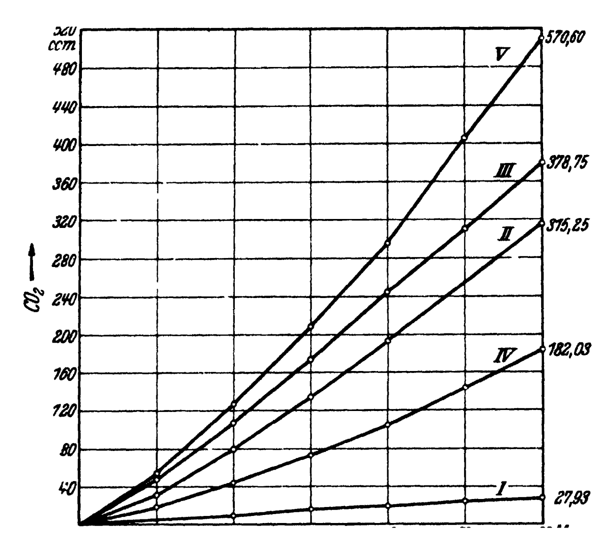


Abb. 2. Kurve I. gewaschene Bakterien. Kurve II dieselben mit Wasch-*Ringer* Kurve III: dieselben mit Cystein (Konz. m/6000). Kurve IV: dieselben mit Cystein (Konz. m/60000). Kurve V: dieselben mit Wasch-*Ringer* und Cystein (Konz. m/60000).

gleicher Mengen von äquimolekularen Lösungen beider Verbindungen verleiht der Bakteriensuspension genau die gleiche Spaltfähigkeit.

Setzt man einer durch Waschen inaktivierten Bakteriensuspension nur so wenig vom Wasch-*Ringer* zu, daß die Spaltfähigkeit nicht bis zu ihrem Maximum wiederhergestellt wird, fügt aber außerdem ein fur sich allein untermaximal wirkendes Quantum Cystein zu, so stellt man fest, daß der Spaltprozeß sofort sein Intensitätsmaximum erreicht, ganz offenbar infolge summierter Wirkung des Cysteins und der aktiven Substanzen im Wasch-*Ringer*.

Daraus kann entnommen werden, daß die Spaltfähigkeit der *Coli*-Bakterien auf einem an die Zellstruktur gebundenen Fermente und auf einem Co-Ferment beruht, das schwächer haftet und in Lösung geht, darum herausgewaschen werden kann. Die Größe der durch Cystein und

Glutathion bewirkten Aktivierung läßt vermuten, daß die Gruppe S—H—S das fragliche Co-Ferment darstellt. Es ist wohl richtig, von einem Co-Ferment zu sprechen, nämlich mit Rücksicht auf die ungemein geringe Substanzmenge, die zur Entfaltung des Vorganges genügt, und weil das einmal erreichte Maximum der Aktivierung durch weiteren Zusatz des wirksamen Stoffes nicht mehr überschritten wird. Die Eigenschaften der S—H—S-Gruppe könnten aber auch an eine Beeinflussung des Reaktionsmilieus im Sinne einer Änderung des Redox-

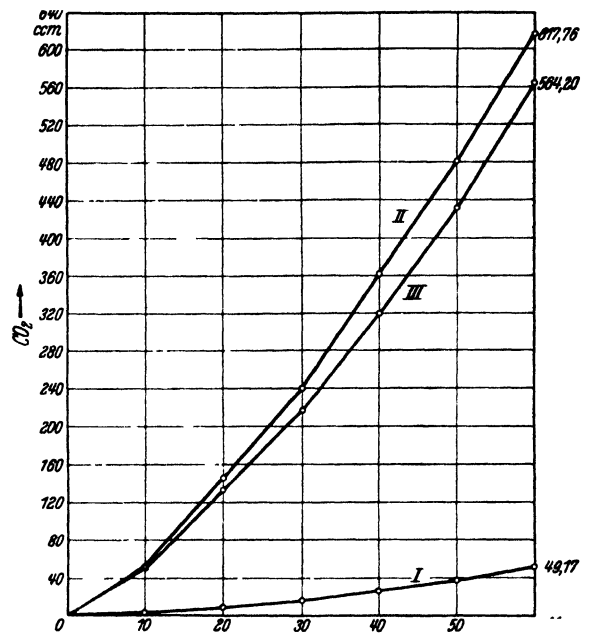


Abb 3. Kurve I gewaschene Bakterien. Kurve II dieselben mit Glutathion (Konz. m/600) Kurve III. dieselben mit Glutathion (Konz. m/6000).

potentials denken lassen, wie es in vielen anderen Fällen zutrifft. Doch liegen Gründe vor, diese Möglichkeit auszuschließen: Einmal machen die winzigen Mengen, in denen Glutathion und Cystein wirksam sind, einen merklichen Einfluß dieser Art unwahrscheinlich; dann stellte sich heraus, daß Ascorbinsaure, die in diesem Sinne hochaktiv ist, auch bei Zusatz in beträchtlichen Mengen zur Aktivierung der Zuckerspaltung unfähig ist.

Es muß erwähnt werden, daß zwei Untersuchungen in nächster Beziehung zu den hier beobachteten Tatbeständen stehen: *Cattaneo* und *Neuberg*[1] fanden, daß bei Hexosediphosphat als Substrat Zusatz von Glutathion zu sehr beträchtlichen Bakterienmengen, auch zu Trockenpräparaten davon, eine Umwandlung der gewöhnlichen *Coli*-

[1] *C. Cattaneo* u. *C. Neuberg*, Biochem. Zeitschr. **272**, 441, 1934.

Gärung in reine Milchsäuregärung bewirkt, derart, daß beinahe 100% Kohlenhydrat zu Milchsäure gespalten wird. *Chaix* und *Fromageot*[1] zeigten, daß durch Zusatz von Glutathion die Gärtätigkeit von Propionsäurebakterien verstärkt wird, und daß Bakterienmengen, die für sich allein zum Glucoseabbau ungenügend sind, dadurch hinreichend gemacht werden.

Experimentelles.

Je sechs *Coli*-Kulturen (gewöhnliches Agar, 24 Stunden, 37°) wurden zusammen in 50 ccm *Ringer* nach *Warburg* suspendiert. Bei 3000 Touren je Minute mußte mindestens 30 Minuten lang zentrifugiert werden, um nahezu völlige Sedimentierung zu erhalten. Danach wurden die abzentrifugierten Keime in 100 ccm *Ringer* suspendiert und von neuem zentrifugiert; dies wurde noch zweimal wiederholt.

In den Fällen, in denen das erste Wasch-*Ringer* zur Aktivierung benutzt wurde, wurden die sechs Kulturen in nur 25 ccm *Ringer* suspendiert.

Die Bakteriengärung wurde nach *Warburgs* Kästchenmethode manometrisch bestimmt. Die Gefäße (16 bis 18 ccm) wurden in 37°-Thermostaten geschüttelt, Füllgas war N_2 (durch Passieren glühender Kupferspäne von O_2 befreit) mit 5% CO_2. In den Seitenansatz wurden 0,25 ccm Glucoselösung eingebracht, deren Konzentration so bemessen war, daß sich nach Einkippen in der Gesamtflüssigkeit ein Zuckergehalt von m/100 ergab.

Nach Erreichen des Temperaturausgleichs wurde eingekippt und mit den Ablesungen begonnen. Die Druckänderungen wurden auf CO_2 bezogen, die ja tatsächlich den größten Teil des entwickelten Gases ausmacht, sei es als unmittelbares Gärungsprodukt, sei es, daß sie infolge Bildung fixer Säuren aus dem Bicarbonat der *Ringer*-Lösung in Freiheit gesetzt wird. Der daneben gebildete Wasserstoff[2] ist bei dieser Berechnung mit einbegriffen.

Es gelangte Cysteinchlorhydrat *Pfanstiehl* und Glutathion der B. D. H. zur Verwendung. Die Adenylpyrophosphorsäure wurde als Natriumsalz verwendet, das durch Behandlung des Bariumsalzes[3] mit der errechneten Menge Natriumsulfat dargestellt wurde; das ausgefallte Bariumsulfat wurde durch Zentrifugieren entfernt. Das Präparat hatte folgende Eigenschaften: Anorganische P_2O_5 = 0%; 7 Sekunden in n HCl (100°) = 14,5%; Gesamt-P_2O_5 = 22% (Gesamt-P = 9,8%). Ba-Gehalt 30%. Adenosin (B. D. H.) bedingt eine beträchtliche CO_2-Retention in der Flüssigkeit. Die Retention wurde berechnet und ist in den mitgeteilten Werten berücksichtigt. Die Adenylsäure wurde als Na-Salz hergestellt durch Behandlung eines Hefepräparats (Erba) mit der theoretischen Menge NaOH.

Zusatz von Phosphat steigert die Gärfähigkeit nicht, weder in den Versuchen mit Adenosin noch in denen mit Adenylsäure.

---

[1] *P. Chaix* u. *Cl. Fromageot*, Bull. Soc. Chim. biol. 18, 1436, 1936. — *Zusatz bei der Korrektur:* In einer sehr interessanten, vor kurzem in „Enzymologia" (1, 32, 1937) erschienenen Arbeit berichten *Chaix* u. *Fromageot* über die aktivierende Wirkung einiger sulfhydrierter und nicht sulfhydrierter Substanzen bei der Glykolyse der Propionsäurebakterien. Es wird auch dort gefunden, daß durch Zusatz von Waschwasser die Glykolyse beträchtlich aktiviert wird. — [2] Vgl. *A. J. Kluyver*, Ergebn. d. Enzymforsch. 4, 230, 1935. — [3] Ich danke auch hier den Herren *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, die mir freundlicherweise das Präparat beschafften.

Protokolle I bis III. Wirkung von Adenylpyrophosphorsäure, Adenosin und Adenylsäure.

	I Adenylpyrophosphorsäure (Konz. etwa m/300)		II Adenosin (Konz. m/450)		III Adenylsäure (Konz. m/450)	
	1	2	3	4	5	6
Hauptraum . .	0,75 ccm *Ringer*-lösung	0,25 ccm *Ringer*lösung 0,5 ccm m/75 Adenylpyrophosphorsäure	1,75 ccm *Ringer*-lösung	1,25 ccm *Ringer*lösung 0,50 ccm m/75 Adenosin	1,75 ccm *Ringer*-lösung	1,25 ccm *Ringer*lösung 0,5 ccm m/75 Adenylsäure
	1 ccm Aufschwemmung der gewaschenen Bakterien		1 ccm Aufschwemmung der gewaschenen Bakterien		1 ccm Aufschwemmung der gewaschenen Bakterien	
Anhang . . .	0,25 ccm Glucoselösung (3,96 mg)		0,25 ccm Glucoselösung (5,9 mg)		0,25 ccm Glucoselösung (5,9 mg)	
60 Min. nach Einkippen cmm CO_2	Ergebnisse vgl. Abb. 1, S. 307				+ 24	+ 253,22

Protokoll IV. Wirkung von Wasch-Ringer und Cystein auf gewaschene Coli-Bakterien.

	1	2	3	4	5
	1 ccm der gewaschenen Bakterien				
Hauptraum .	1,75 ccm *Ringer*-lösung	1,25 ccm *Ringer*lösung 0,50 ccm Wasch-*Ringer*	1,65 ccm *Ringer*lösung 0,1 ccm m/200 Cystein	1,65 ccm *Ringer*lösung 0,1 ccm m/2000 Cystein	1,15 ccm *Ringer*lösung 0,50 ccm Wasch-*Ringer* 0,1 ccm m/2000 Cystein
Anhang . . .	0,25 ccm Glucoselösung (5,9 mg)				
60 Min. nach Einkippen cmm CO_2	Ergebnisse siehe Abb. 2, S. 308				

Protokoll V. Wirkung von Glutathion und Cystein (s. auch Abb. 3, S. 309).

	1	2	3	4	5
	1 ccm der gewaschenen Bakterien				
Hauptraum . .	1,75 ccm *Ringer*-lösung	1,65 ccm *Ringer*lösung 0,1 ccm m/20 Glutathion	1,65 ccm *Ringer*lösung 0,1 ccm m/200 Glutathion	1,65 ccm *Ringer*lösung 0,1 ccm m/20 Cystein	1,65 ccm *Ringer*lösung 0,1 ccm m/200 Cystein
Anhang . . .	0,25 ccm Glucoselösung (5,9 mg)				
60 Min. nach Einkippen cmm CO_2	+ 49,17	+ 617,76	+ 564,20	+ 614,13	+ 576,08

(Aus dem Ozeanograph. Institut Split und dem Botanischen Institut Zagreb.)

Über den Formenkreis von Beggiatoa mirabilis.

Von

Z. Klas.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Mai 1937.)

In Fortsetzung meiner Studien über die Schwefelflora im Hafen von *Split*[1] (Jugoslavien) gelang es mir, Ende Februar 1937 unter anderen auch ein reiches Beggiatoen-Lager zu entdecken. Außer *Beggiatoa alba*, *B. leptomitiformis* und *B. arachnoidea* war in dem Material auch *Beggiatoa mirabilis* reichlich vertreten. Nach dem bisher bekannten ist dies *der erste Fund* von *Beggiatoa mirabilis* für das Adriatische Meer und die Flora Jugoslaviens.

Was die nähere Beschreibung des Standortes sowie der ökologischen Verhältnisse anbelangt, verweise ich auf meine demnächst erscheinende Gesamtdarstellung der Schwefelflora von Split. Hier sollen nur einige die Systematik der Beggiatoen und speziell der Art *B. mirabilis Cohn* betreffende Beobachtungen und Erwägungen mitgeteilt werden.

Als ich das gesammelte frische Material von *B. mirabilis*, das einem einzigen Standort entstammte (Mündung einer Schwefelquelle), untersuchte, fiel mir auf, daß sich darin zwei durch verschiedene Breite der Fäden mit Leichtigkeit zu unterscheidende Gruppen von Organismen vorfanden. Obwohl die Breite aller Fäden den im *Bavendamm*schen System für die Art *Beggiatoa mirabilis Cohn* angegebenen Maßen entsprach, erschien es mir doch eigentümlich, daß ich zwar, wie innerhalb der Gruppe der schmäleren, so auch in der Gruppe der breiteren Fäden gewisse Variationen der Breite beobachten konnte, aber keine Übergänge zwischen den beiden. Ich entschloß mich daher zu eingehenderer Untersuchung teils an lebendem, teils an in *Perenyi*-Gemisch fixiertem Material. Zugleich fahndete ich, wie nach der Originaldiagnose *Cohns*, so auch nach allen bisher erschienenen Angaben über *Beggiatoa mirabilis*.

Um mittels hinreichend zahlreicher Messungen die Breite der Fäden zu ermitteln, führte ich von jeder Gruppe, der schmalen wie auch der breiten, je 100 Messungen der Breite durch, zugleich aber auch — da ich den Eindruck bekam, daß sich bei den schmalfädigen Beggiatoen

---

[1] *Z. Klas*, Arch. f. Protistenkde. 88, 121 ff., 1936; Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. in Wien, Math.-naturwiss. Kl., Abt. I, 145, 309 ff., 1936.

die Höhe der Zellen anders zu ihrer Breite verhält als bei den breitfädigen — ebensoviele Messungen der Länge bzw. Höhe der Zellen und bestimmte rechnerisch dieses Verhältnis.

In den Abb. 1 bis 3 sind die Ergebnisse der Messungen graphisch dargestellt. Wie erwahnt, wurden von jeder Gruppe je 100 Messungen vorgenommen. Eine noch größere Anzahl von Messungen, etwa je 500, möchte vielleicht die kleineren Unregelmäßigkeiten der Kurven (Abb. 1, Abfall bei 18,1 und 34,6 μ) beheben und zu strenger Eingipfligkeit beider Kurven fuhren. Immerhin ist auch aus den vorliegenden Kurven klar ersichtlich, daß der Eindruck, den schon die Durchsicht der ersten Probe hervorrief, vollkommen richtig war, daß nämlich im Untersuchungsmaterial tatsächlich zwei Gruppen von Organismen vertreten waren, deren

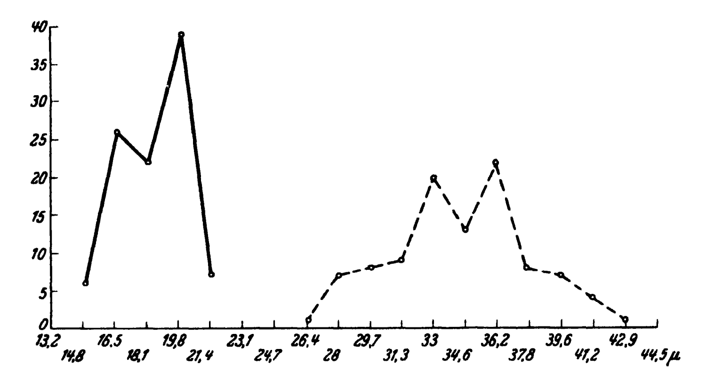


Abb 1. Variationskurven der Zellenbreiten, ——— von *Beggiatoa mirabilis* (*Cohn*) *Klas*, - - - - von *Beggiatoa gigantea Klas.*

Breite innerhalb gewisser Grenzen variierte, die sich aber voneinander streng unterschieden. An die breitesten Faden der ersten (schmalfadigen) Gruppe schließen sich nicht etwa unmittelbar die schmalsten Faden der zweiten (breitfadigen) Gruppe an, sondern die Kurve bricht nach der letzten Senkung ab und greift nicht in die zweite Kurve uber. Auch der Umstand, daß die häufigsten Breitenwerte der ersten bei 16.5 bis 19,8 μ, die der zweiten dagegen bei 33 bis 36,2 μ liegen, spricht für die Selbstandigkeit beider Organismengruppen.

Die Hohe der Zellen ist, wie ich glaube, bei den fadenbildenden Schwefelbakterien nur mit außerster Vorsicht als diagnostisches Merkmal zu verwenden, ähnlich wie bei den Cyanophyceen. Je nachdem man kurz vor der Teilung stehende oder eben geteilte Zellen mißt, wird sie großer bzw. kleiner ausfallen. Darauf weist auch der Umstand hin, daß in so manchen Diagnosen Bestimmungen, wie etwa „4 bis 8 μ hoch“ vorkommen, also gerade eine Verdoppelung. Um diese Fehlerquelle bei den Messungen der Zellenhöhe der untersuchten Organismen zu

vermindern, habe ich bei den beiden Organismengruppen alle vorkommende Höhenwerte statistisch verarbeitet. Die Ergebnisse stellt Abb. 2 dar. Wie ersichtlich, sind die absoluten Maße der Höhe der Zellen der beiden Gruppen annähernd gleich und liegen zwischen 5 bis 13 μ.

Vergleicht man aber bei beiden Gruppen das Verhältnis der Höhe und der Breite der Zellen, so ergibt sich ein Bild, wie es untenstehende Abb. 3 einerseits für die schmalfädigen und andererseits für die breitfädigen Organismen veranschaulicht. Das graphische Bild wurde auf Grund der errechneten Quotienten Zellenbreite/Zellenhöhe von Vertretern beider Gruppen — es wurden je 100 Messungen, insgesamt 400 vorgenommen — ausgearbeitet und liefert einen weiteren Beweis für die Notwendigkeit und Berechtigung der Trennung beider Gruppen.

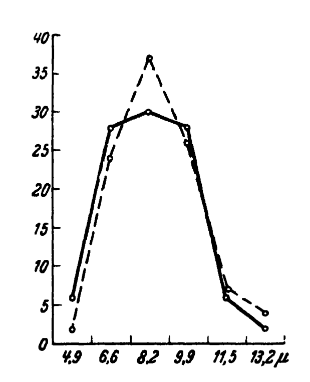


Abb. 2. Variationskurven der Zellenhöhen, ——— von *B. mirabilis* (*Cohn*) *Klas*, – – – von *B. gigantea Klas*.

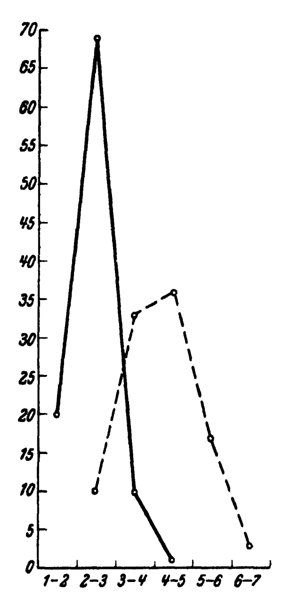


Abb. 3. Variationskurven der errechneten Quotienten Zellenbreite : Zellenhöhe, ——— von *B. mirabilis* (*Cohn*) *Klas*, – – – von *B. gigantea Klas*.

Die durchgeführten Messungen und Berechnungen ergaben folgendes:

1. Im untersuchten Material aus Split waren zwei Formen von *Beggiatoa* vertreten, eine schmälere und eine breitere, zwischen denen keine Übergänge festzustellen waren.

2. Die Breite der Fäden der schmalfädigen Gruppe variierte von 14,8 bis 21,4 μ. Als Durchschnittswert wurde 18,4 μ errechnet.

3. Die Breite der Fäden der zweiten Gruppe von Organismen (breitfädige) variierte von 26,4 bis 49,2 μ, und als Durchschnittswert ergab sich 34,4 μ.

4. Die Höhe der Zellen der ersten und zweiten Gruppe von Organismen war annähernd gleich. Bei den schmalfädigen Organismen

variierte sie von 4,9 bis 13,2 μ (Durchschnittswert 8,43 μ), und bei den breitfädigen ebenso (Durchschnittswert 8,53 μ).

5. Während die absoluten Maße der Höhe der Zellen bei beiden Gruppen keine wesentliche Unterschiede aufwiesen, ist das Verhältnis der Höhe der Zellen zu ihrer Breite bei beiden Gruppen recht verschieden; bei der schmalfädigen Gruppe ist es durchschnittlich 1 : 2,3, bei der breitfädigen dagegen 1 : 4,11. Bei den schmalfädigen Formen sind die Zellen doppelt, bei den breitfädigen Formen viermal so breit wie hoch.

Bevor wir diese Ergebnisse systematisch verwerten, wollen wir sehen, wie es überhaupt mit der systematischen Einteilung der Beggiatoen bestellt ist.

Bekanntlich beruhte die systematische Einteilung der Schwefelbakterien, und insbesondere der fadenförmigen Beggiatoaceen, auf der Menge, Größe und Lagerung der Schwefeleinschlüsse sowie auf den Großenbzw. Breitenverhältnissen der Fäden. Nachdem aber *Winogradsky* nachgewiesen hat, daß dem ersten Merkmal kein systematischer Wert zukommt, da es durch Standortsverhältnisse bzw. durch reichere oder spärlichere Zufuhr von H_2S und O bedingt wird, blieb als einziges Unterscheidungsmerkmal der Arten die Breite der Fäden übrig. Aber schon *Winogradsky* betonte, daß damit keineswegs die Bestimmung der Arten erleichtert wird, da man „eine ganze Reihe von ‚Übergangsformen' findet, d. h. Formen, welche bezüglich ihrer Fadendicke der einen oder der anderen mit Speziesnamen belegten Form sich nähern oder genau in der Mitte zwischen denselben stehen". Den sich aufdrängenden Schluß, daß alle Formen in den Entwicklungskreis nur einer Art gehören, hält *Winogradsky* auf Grund seiner Beobachtungen für unrichtig und schlägt vor, „sämtliche Formen in Gruppen zusammenzufassen, deren Fadendicke sich zwischen bestimmten Grenzen bewegt, und diese Gruppen mit Speziesnamen zu belegen." *Winogradsky* stellte eine Anzahl von Arten auf, deren Breiten aneinander anschlossen, und betonte, daß diese Einteilung auf Konvenienz beruht.

Winogradsky arbeitete nur mit schmalfädigen Beggiatoen und seine Erwägungen und Vorschläge beziehen sich nur auf diese, berühren dagegen weder *B. arachnoidea* noch *B. mirabilis*. Wenn ich doch seine Ausführungen hier eingehender dargestellt habe, so geschah dies nicht nur deshalb, weil sie am besten die Problematik des Artenbegriffes im System der Schwefelbakterien erkennen lassen, sondern auch, weil andere Autoren seinem Beispiel gefolgt sind und seine Betrachtungsweise auf *B. arachnoidea* und *B. mirabilis* ausgedehnt haben. So finden wir bei *Hinze* (1902, S. 194) folgende Sätze: „. . . Von der dünnsten *B. minima* finden sich bis zur dicksten *B. mirabilis* die verschiedensten Maße, und doch ist die Dicke für jeden Faden konstant, wie *Winogradsky* zu beweisen gesucht hat. — Es ergibt sich hieraus, daß die Klassifikation der Beggiatoaceen nur auf konventionellen Prinzipien beruhen kann. — Von welcher unteren Grenze an man einen Faden zu *B. mirabilis* rechnen soll, läßt sich auch wieder nur nach Übereinkunft bestimmen, da sich die Übergänge zu *B. arachnoidea* in mannigfaltigster Zahl finden . . ." Auch *Bavendamm* (S. 105) äußert sich in einer Anmerkung zu *B. alba* im gleichen Sinne: „Da überall Übergänge vorkommen, empfiehlt es sich, wie es auch *Hinze* und *Koppe* getan haben, die

Zahlen für die Dicke der Faden aneinander anzuschließen, d. h. hier z. B. statt wie sonst 2,5 bis 4 μ, 2,5 bis 5 μ zu schreiben, damit der Anschluß an die 5 bis 14 μ dicke *B. arachnoidea* erreicht wird."

Gleichgültig, ob man es für erlaubt hält, Arten nach einem rein konventionellem Übereinkommen zu begrenzen, oder nicht, kann ich es doch keinesfalls für erlaubt halten, die feststehende Diagnose einer Art, soweit es sich um die angegebenen Größenmerkmale handelt, vollständig zu verändern und dabei doch, wie den ursprünglichen Artennamen, so auch den Namen seines Autors unverändert beizubehalten. Was für eine Verwirrung dadurch entstehen kann und schließlich auch entstehen muß, zeigt am besten der Fall *Beggiatoa mirabilis*.

Die ursprüngliche Originaldiagnose *Cohns* (S. 81/82) lautet: „*Beggiatoa (Oscillaria) mirabilis Cohn*, filamentis intricatis, mobilibus, contractilibus, flexillimis, evaginatis, apice torundatis, ecoloribus, $^{1}/_{130}'''$ (0,016 mm) crassis, lineas plures longis; cellulae (articuli) singulae diametro fere dimidio breviores, membrana tenerrima, granulis hyalinis nigricantibus $^{1}/_{2000}'''$ crassis confertae. Algas et lapides strato mucoso arachnoideo niveo induit, acidum hydrothionicum exhalat. In Aquario marino Wratislaviensi vere 1865."

Beim Vergleich dieser Originaldiagnose *Cohns* mit späteren Diagnosen und Beschreibungen der „*Beggiatoa mirabilis Cohn*", findet man, daß sich nur einige Autoren streng an die *Cohn*sche Definition halten und als *B. mirabilis Cohn* nur die 16 μ breite Form bezeichnen, während andere, teils auf Grund eigener Untersuchungen, teils sich an Bestimmungen anderer Autoren haltend, den Begriff der Art weitgehend verändern. Nicht nur wurden Maximalbreitenwerte eingeführt, die fast um das Vierfache den von *Cohn* angegebenen Wert übertreffen, sondern es wird sogar als geringster Breitenwert, als untere Grenze, eine Zahl angegeben, die schon oberhalb der *Cohn*schen Breitebestimmung liegt. Es geben als Breite der „*Beggiatoa mirabilis Cohn*" an: *Cohn* (1865) 16 μ, *Warming* (1875) 20 bis 40 μ, *Engler* (1884) 20 bis 30 μ, *Kolkwitz* (1897) 30 bis 38 μ, *Migula* (1900) 16 μ, *Massart* (1902) 16 μ, *Hinze* (1902) 20 bis 45 (55) μ, *Kolkwitz* (1918) 30 bis 42 μ, *Bavendamm* (1924) 16 bis 45 μ, *Bergey et al.* (1930) 16 μ, *Ellis* (1932) 15 bis 45 μ.

Ähnlich wird der *B. arachnoidea*, der zweitgrößten in Systemen aufgeführten *Beggiatoa*, von *Agardh* eine Breite von 5 bis 6,5 μ zugeschrieben und ebenso von *Rabenhorst* (S. 94), *Migula* (II, S. 1041) und *Hansgirg* (II, S. 186); *Engler* (S. 189) gibt eine Breite von 5 bis 8 μ an; im *Bavendamm*schen System (S. 104) wird die Breite sogar auf 5 bis 14 μ erhöht. *Ellis* (S. 105) gibt in seinem System wieder nur einen Breitenwert von 5 bis 6 μ an. Alle Organismen aber, die von 5 bis 6 μ Breite ebenso wie die als 5 bis 14 μ breit vermerkten, tragen den Namen „*Beggiatoa arachnoidea (Agardh) Rabenhorst.*" Immerhin ist es hier doch nicht so weit gekommen wie bei *B. mirabilis*, bei der *Hinze* beispielsweise vorgeschlagen hat, die 16 μ breite *Massart*sche *B. mirabilis*, die doch vollkommen der Originaldiagnose *Cohns* entspricht, überhaupt nicht als *B. mirabilis* zu betrachten!

Daß diese Behandlungsweise nicht im Einklang mit den grundlegenden Prinzipien der Systematik steht, bedarf wohl keiner Beweisführung. Es fragt sich bloß, wie und auf welche Weise die Ergebnisse

verschiedener Forscher, *B. mirabilis* betreffend, widerspruchslos und folgerichtig zu vereinigen wären.

Es ist nun ohne Zweifel richtig, daß sich der systematischen Bearbeitung der Schwefelbakterien und insbesondere einer vergleichenden Untersuchung und Revision mitunter unüberbrückbar scheinende Schwierigkeiten entgegenstellen. Wenn auch die Schwefelbakterien recht verbreitet sind, so sind doch einzelne Arten, darunter gerade *Beggiatoa mirabilis*, verhältnismäßig selten. Wie die Seltenheit einzelner Arten, so sind auch die oft zu beobachtende Launigkeit ihres Auftretens sowie ihr rasches Verschwinden gewiß nicht von Vorteil. Eine der größten Schwierigkeiten bildet aber der Mangel an Exsikkatenmaterial sowie an Dauerpräparaten. Man ist infolgedessen auf Abbildungen (Zeichnungen und Photographien) sowie Beschreibungen beschränkt, die aber gerade mit Rücksicht auf die so oft erwähnten „Übergangsformen“ und in bezug auf die Größenverhältnisse, die mir oft auf Grund unzureichender Messungen angegeben zu sein scheinen, nur zu oft unzulänglich sind. Gewiß könnten viele Mängel des bestehenden Systems durch Anwendung von Kulturmethoden (Roh- und Reinkulturen) behoben werden. Dieser Weg wurde aber wegen erheblicher Schwierigkeiten nur selten betreten (*Winogradsky*, *v. Niel*). Die Ergebnisse lassen jedoch schon nach den bisherigen Erfahrungen vermuten, daß dieser Weg zu einer vollkommenen Umgestaltung des Systems der Schwefelbakterien führen wird. Bis jedoch diese Methode konsequent bei allen zur Zeit als Arten aufgestellten Schwefelbakterien durchgeführt wird, müssen wir uns an das bestehende System halten ohne Rücksicht darauf, ob es als ein provisorisches oder dauerndes, konventionelles oder phylogenetisches System aufzufassen ist.

Wenn wir nun die angeführten Angaben über die Breite der „*Beggiatoa mirabilis Cohn*“ prüfen, so sehen wir, daß einige Autoren (*Cohn*, *Massart*) eine schmale Form vor sich hatten, andere aber (*Kolkwitz*) eine bei weitem breitere. In systematischen Werken wurden nun entweder beide Formen als *Beggiatoa mirabilis*, die aber in diesem Falle nicht mehr als „*B. mirabilis Cohn*“ bezeichnet werden durfte, vereinigt und die Grenzwerte der Breiten so genommen, daß sie beide Formen einschlossen (*Bavendamm*, *Ellis*), oder man berücksichtigte nur die schmale Form (*Migula*, *Bergey*).

Nach dieser Feststellung komme ich zu den Ergebnissen meiner eigenen Untersuchungen zurück und prüfe, wie sich die aus ihnen abgeleiteten Schlüsse zu den Befunden anderer Autoren verhalten.

Das gleichzeitige Vorhandensein von zwei durch ihre Breitendimensionen, sowie durch das Verhältnis der Höhe der Zellen zu ihrer Breite so beträchtlich verschiedenen Gruppen von Organismen an ein und demselben Standort empfiehlt dringend ihre systematische Trennung. Denn es ist unwahrscheinlich, daß an ein und demselben sehr engen Standort ein Organismus derart variiert, daß sich hinsichtlich der Breitendimensionen und des speziellen Verhältnisses der Höhe der Zellen zu ihrer Breite solche Unterschiede ergeben würden, wie die Kurven, Abb. 1 (S. 313) und 3 (S. 314), oder die Mikroaufnahmen, Abb. 4 und 5, veranschaulichen. Daß mitunter sehr weitgehende Variationen bei einem Organismus vorkommen, ist unzweifelhaft. Handelt es sich dabei aber um eine Art, so sind diese Variationen verbunden und gehen ineinander

über, sind aber nicht übergangslos oder so schroff getrennt, wie dies bei meinen Organismen der Fall ist.

Nach meinen Messungen beträgt die Breite der schmalen Form 14,8 bis 21,4 μ, der breiten dagegen 26,4 bis 49,9 μ. Im ersten Falle verhält sich die Höhe der Zellen zu ihrer Breite durchschnittlich wie 1 : 2,3, im zweiten wie 1 : 4,11. Ob wir nun beide Formen als Arten oder Varietäten gelten lassen, ist ziemlich gleichgültig (vgl. die Anmerkung *Winogradskys*, S. 22). Da aber bisher bei den Beggiatoaceen



Abb. 4. *Beggiatoa gigantea Klas.* Gesamtbild (Vergr. etwa 150 ×). Mikrophoto, Lebendaufnahme.

noch keine Varietaten aufgestellt bzw. angenommen wurden, und da außerdem die Formen wirklich gut unterscheidbar sind, ziehe ich vor, die beobachteten beiden als Arten zu trennen.

Auf Grund alles dessen schlage ich folgende Diagnosen vor:

1. Beggiatoa mirabilis (*Cohn*) *Klas*: Faden 14,8 bis 21,4 μ (durchschnittlich 17,3 μ) breit, mit an entschwefelten Organismen besonders deutlicher Gliederung in Zellen. Höhe der Zellen 4,9 bis 13,2 μ (durchschnittlich 8,43 μ), am häufigsten doppelt so breit wie hoch. Endzelle abgerundet, zuweilen gebogen. Im lebendem Zustand und unter normalen Bedingungen dicht mit Schwefeltröpfchen erfüllt, nicht eingeschnürt.

2. Beggiatoa gigantea Klas: Fäden 26,4 bis 42,9 μ (durchschnittlich 34,4 μ) breit, mit an entschwefelten Organismen besonders deutlicher

Gliederung in Zellen. Höhe der Zellen 4,9 bis 13,2 μ (durchschnittlich 8,53 μ), am häufigsten bis vierfach so breit wie hoch. Endzelle abgerundet bis kegelförmig verjüngt. Im lebenden Zustande und unter normalen Bedingungen dicht mit Schwefeltröpfchen erfüllt, nicht oder schwach eingeschnürt. Bei Behandlung mit Chemikalien bzw. Absterben der Fäden erfolgt starke Vorwölbung der Seitenwände.

Die erste Art, *B. mirabilis* (*Cohn*) *Klas*, schließt also in sich die Breitenmasse der schmalen Formen aus Split sowie der ursprünglichen und später von *Massart* untersuchten *B. mirabilis Cohn* ein, die zweite, *B. gigantea*[1], dagegen die breiten Formen aus Split sowie die von *Kolkwitz* beobachteten und unter *B. mirabilis Cohn* eingereihten Formen aus Kiel und dem Solgraben von Artern.



Abb. 5. *B. gigantea* (waagerecht) und *B. mirabilis* (senkrecht) (Vergr. etwa 500 ×). Mikrophoto, Lebendaufnahme.

Über die Zugehörigkeit der von *Warming* (Breite 20 bis 40 μ), *Engler* (20 bis 30 μ) und *Hinze* (20 bis 45 bzw. 55 μ) erwähnten Formen ist eine Entscheidung wegen der Spärlichkeit der Angaben und der vorhin erwähnten Schwierigkeiten wesentlich schwieriger. Nach einer Bemerkung *Hinze*s könnte man diese Formen vielleicht in *B. mirabilis* (*Cohn*) *Klas* und in *B. gigantea* aufspalten, was natürlich einen anderen oberen Grenzwert dieser Art (55 μ statt 42,9) erfordern würde. *Hinze* (S. 195) sagt nämlich: „*Cohn* hat bei seinen Abbildungen die Zellen nahezu quadratisch gezeichnet. Bei den dünneren Formen der *B. mirabilis* ist dies die Regel; bei den dickeren herrscht auf dem Längsschnitt die Gestalt des Rechteckes vor, wie auch bei den *Warming*schen und *Engler*schen Abbildungen zu erkennen ist. Und zwar ist dies meist derart, daß die längere Seite, den Querwanden entsprechend, etwa doppelt so groß wie die kürzere ist.“ Da diese Angabe, wenn auch nicht in Einzelheiten, so doch grundsätzlich mit meinen Beobachtungen übereinstimmt, nach welchen die Höhe der Zellen bei den breiten

[1] Bei *Lehmann-Neumann* (S. 4) wird in der Anmerkung die *Hinze*sche 55 μ breite *B. mirabilis* als *B. gigantea* zitiert. Es handelt sich aber hier bloß um eine auf Irrtum und Ungenauigkeit beruhende Bezeichnung ohne irgendwelche Bedeutung, wie auch *Bavendamm* (S. 99) bemerkt.

Formen (*B. gigantea*) im Verhältnis zu ihrer Breite bei weitem geringer ist als bei den schmalen Formen [*B. mirabilis* (*Cohn*) *Klas*], halte ich eine Aufspaltung der erwahnten Formen in die neu definierten bzw. neu aufgestellten Arten gerechtfertigt. Immerhin dürfte eine endgültige Entscheidung darüber nur durch eine erneute eingehende Untersuchung der Beggiatoenflora der *Warming*schen, *Engler*schen sowie *Hinze*schen Standorte erbracht werden können.

Zusammenfassung.

1. An der Mündung einer Schwefelquelle im Hafen von *Split* (*Adriatisches Meer, Jugoslavien*) wurde ein reiches Beggiatoenlager entdeckt. Zwischen anderen, mehr oder weniger allgemein verbreiteten Arten (*Beggiatoa alba, B. leptomitiformis, B. arachnoidea*) befanden sich auch reichliche Lager von zwei verschieden breiten Formen einer größeren *Beggiatoa*, die nach dem bestehenden System zu der damit für das Adriatische Meer und Jugoslavien zuerst nachgewiesenen *B. mirabilis Cohn* gestellt werden mußten.

2. Durch variationsstatische Verarbeitung des Materials ließ sich zeigen, daß in ihm zwei durch die Breite der Fäden sowie durch das Verhältnis der Zellenhöhe zu Zellenbreite zu unterscheidende, übergangslose Formen enthalten sind, deren systematische Trennung notwendig erschien. Beide Formen wurden als Arten aufgestellt. Die schmälere Form (14,8 bis 21,4 μ) wurde als *B. mirabilis* (*Cohn*) *Klas*. die breitere Form (26,4 bis 42,8 μ) dagegen als *B. gigantea Klas* bezeichnet.

3. Auf Grund eingehender systematischer Analyse und unter Berücksichtigung aller alteren Angaben ist meiner Ansicht nach diese Trennung auch auf alle 15 bis 45 bzw. 55 μ breiten, bisher unrichtigerweise als *B. mirabilis Cohn* benannte Beggiatoenformen anzuwenden, wobei dann natürlich der obere Breitengrenzwert der *B. gigantea* mit 55 μ zu fassen wäre.

Literatur.

1) *W. Bavendamm*, Pflanzenforsch. Heft 2, Jena 1924. — 2) *Bergey et al.*, Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, *Williams* and *Wolkins*, 1930. — 3) *F. Cohn*, Hedwigia 4, 81, 1865. — 4) *A. Engler*, 4. Ber. d. Komm. z. Unters. d. deutsch. Meere in Kiel 1883, S. 187. — 5) *A. Hansgirg*, Prodromus der Algenflora von Bohmen, II. Teil, Prag, *Fr. Rionáč*, 1892. — 6) *H. Hinze*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **19**, 369, 1901; Wissensch. Meeresunters., Abt. Kiel, N. F. **6**, 185, 1902. — 7) *R. Kolkwitz*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **15**, 460, 1897; **36**, 218, 1918. — 8) *K. B. Lehmann* u. *R. Neumann*, Bakteriologische Diagnostik **2**, München, *J. F. Lehmann*, 1919/20. — 9) *J. Massart*, Rec. de l'Inst. Botan. Univ. d. Bruxelles **1**, 5, 1902 — 10) *W. Migula*, System der Bakterien **2**, Jena, G. Fischer, 1900. — 11) *L. Rabenhorst*, Flora Europaea Algarum, sect. II, Leipzig, *E. Kummer*, 1865. — 12) *E. Warming*, Videnskab. Medd. Kopenhagen, Nr. 2 —28, 357 ff., 1875. — 13) *S. Winogradsky*, Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien **1**, Leipzig 1888.

(Aus dem Botanischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt a. M.)

Der Einfluß einiger organischer Säuren auf die Keimung der Askosporen von Bombardia lunata Zckl.*

Von

Siegfried Windisch.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Mai 1937.)

Bei den vererbungskundlichen Untersuchungen *Zicklers* (1934) an *Bombardia lunata Zckl.* stellte sich heraus, daß die hellen oder farblosen Sporen, die von hellen Rassen stammen, viel schlechter keimen als die dunkelgrünen, fast schwarzen Sporen der dunklen Rassen. Für die Tetradenanalyse kam es darauf an, möglichst aus jeder der acht Sporen im Askus eine Kultur zu erziehen, und der häufige Ausfall infolge Nichtauskeimens von Sporen und besonders von hellen Sporen wurde sehr störend empfunden. Daraus ergab sich die Anregung, die Keimbedingungen dieser Sporen zu untersuchen, insbesondere ob und wie sich eine Erhöhung des Hundertsatzes gekeimter Sporen erreichen ließe. Die hellen Sporen keimten auch bei mir schwer, normalerweise zu 5 bis 8, höchstens zu 10 %, so daß man mit ihnen schlecht arbeiten kann. Bevor man jedoch der Frage einer Verbesserung der Keimprozente der hellen Sporen nähertreten will, muß man erst das Keimverhalten und die Möglichkeiten einer chemischen Beeinflussung von gut keimenden dunklen Sporen prüfen. Das war das Ziel meiner Untersuchungen. Die hier in Betracht gezogenen Versuche sind demnach sämtlich mit dunklen Sporen ausgeführt worden.

Versuche über die Sporenkeimung einwandfrei anzustellen, scheint zunächst einfach zu sein. Es ergibt sich aber bei eingehenderer Beschäftigung damit, daß, will man die Hundertsätze gekeimter Sporen unter bestimmten Bedingungen zahlenmäßig genau erfassen, die große Zahl der möglichen Versuchsfehler die erstrebte Genauigkeit nur schwer erreichen läßt. Im übrigen konnte ich mich nicht an bestimmte einschlägige Arbeitsmethoden halten, da es fast keine Arbeiten über die Keimung oder gar Keimphysiologie von *Askosporen* gibt. Die vorhandenen keimphysiologischen Arbeiten sind meist mit Sporen von Rost- oder Brandpilzen oder Konidien von Askomyceten (Schimmelpilzen) oder Oomyceten und einzelnen anderen Pilzen ausgeführt worden. Zum Teil sind das parasitische Pilze, deren Sporen an feststehende Umweltsbedingungen angepaßt sind und deshalb in ihrem

* Inaugural-Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt a. M.

Keimverhalten keine Norm bilden. *Bombardia lunata* ist aber ein koprophiler Ascomycet.

Die meisten Forscher haben Sporen in Wasser oder Nährlösung gesät, weil es oft nur darauf ankam, ob überhaupt Keimung eintrat. Hin und wieder sind die Mengen gekeimter Sporen abgeschätzt [*Kirmsse* (1924), *Wüthrich* (1892), *Richards* (1897) u. a.], selten gezählt worden. Zu den wenigen, die größere Mengen von Sporen gezählt haben, gehören *Burgert* (1934), der Keimungsuntersuchungen an *Phyllosticta solitaria* ausgeführt hat, und *Brown* (1922), der in der ersten Hälfte seiner Arbeit je Versuch mindestens 100 Sporen von *Botrytis*, im ganzen also mindestens 18000, in Betracht gezogen hat. Für seine weiteren Versuche war ihm dieses Vorgehen zu zeitraubend und genügte nicht immer seinen Anforderungen, weil er auch den Wachstumsverlauf des Mycels unter Kohlensäureeinfluß verfolgen wollte. Auch *Hassebrauk* (1932) hat je Versuch 600 bis 800 Rostsporen gezählt. Bei *Hemmis* (1934) Untersuchungen über die Verbreitung der Roggenroste in Japan und den Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf Keimung und Infektionskraft von deren Sporen hat sein Mitarbeiter *Abe* über 51000 Sporen gezählt. Von der Aufzählung weiterer Arbeiten, in denen aber genaue Zahlenangaben fehlen, sehe ich ab. Ziemlich genau (1500 bis 2000 Sporen je Versuch) muß wohl auch *Doran* (1922) gezählt haben.

Mir kam es zunächst darauf an festzustellen, ob die β-Indolylessigsäure eine stimulierende Wirkung auf die Sporenkeimung ausübt. Eine solche war nicht eindeutig zu erkennen, und es schien von Interesse zu untersuchen, wie einfache organische Säuren wirken. Als solche wurden gewählt Essig-, Wein-, Malein- und Apfelsäure.

Sporenmaterial.

Die nötigen Sporenmengen beschaffte ich mir im Anfang dadurch, daß ich eine dunkle und eine helle Rasse kreuzte, indem ich z. B. eine dunkle Reinkultur mit einer Spermatienaufschwemmung einer hellen spermatisierte [vgl. *Zickler* (1934)]. Alle Reinkulturen wurden in Schrägagarröhrchen mit 2 % Agar und 2 % Biomalz gezogen. Nach 3 bis 4 Wochen erschienen dann bis stecknadelkopfgroße Perithecien, die bei ihrer Reife die Sporen an die Glaswand in Richtung des Lichtes ausschleuderten. Solche Röhrchen, die reife, ausgeschleuderte Sporen enthielten, wurden mit keimfreiem destilliertem Wasser beschickt und durchgeschüttelt; die so erhaltenen Sporenaufschwemmungen wurden für die Versuche verwandt. — In einer kurzen Übergangszeit benutzte ich nur dunkle Sporen aus Kreuzungen zweier dunkler Rassen mit entgegengesetzten Sterilitätsfaktoren. Für alle weiteren Versuche, rund 90 % aller, wurden nur noch dunkle Wildsporen verwandt, die auch auf Biomalzschrägagar gezogen wurden. Bei ihrer Aussaat erhält man natürlich Mischkulturen, die Sporen mit beiderlei Sterilitätsfaktoren enthalten. Solche Mischkulturen bilden daher Fruchtkörper aus, deren Sporen immer wieder zu neuen Aussaaten benutzt werden können. Aus ihnen entwickelt sich ein sehr kräftiges Mycel, und schon nach 4 bis 5 Wochen waren meist viele Sporen aus reifen Fruchtkörpern ausgeschossen. Sie konnten, je nach Vorgang und Zweck, entweder trocken mit abgeflammtem Draht aus dem Kulturröhrchen herausgeholt oder aufgeschwemmt werden.

Die Sporen hatten jeweils etwa von 18 bis 20 Uhr bis zum nächsten Morgen 8 oder 9 Uhr Zeit zu keimen. Die Keimung erfolgt unter normalen

Verhältnissen nach ungefähr 6 bis 7 Stunden. Die Kontrollen hatten schon im Alter von etwa 15 Stunden kleine Mycelien gebildet. Als Keimbild zeigten die Sporen entweder einen geraden Keimschlauch (in der Verlängerung der Längsachse der Sporen) oder — häufiger — einen solchen, an dem die Spore im Winkel von 90° anliegt. In diesem Falle teilt sich die ausgetretene Keimblase längs, und die beiden jungen Hyphenspitzen wachsen am Sporenscheitel zurück. Sind diese Spitzen nur bis halbsporenlang, so sieht der Keimschlauch wie ein Dreieck aus: Dreieckstadium. Wenn die Hyphe ausgewachsen ist, liegt sie zumeist nicht mehr an. Früher oder später treten Verzweigungen hinzu.

Methodik.

Allgemeines. Da es bei den Sporen von *Bombardia lunata* nötig war, die Keimung unter günstigen Bedingungen zu untersuchen, mußte ich damit rechnen, daß die Keimhundertsätze in Versuch und Kontrolle oft wenig voneinander verschieden sein würden. Daher war eine genaue Zählung, Spore für Spore, unerläßlich. Weil es mir aber auch, im Gegensatz zu *Brown*, nur auf die Keimung und nicht auf das Weiterwachsen ankam, konnte ich nötigenfalls die gekeimten Sporen abtöten, ehe das Mycel ein Zählen verhinderte. Alle Zählungen wurden bei 280facher Vergrößerung unter dem Mikroskop vorgenommen, wobei das Objekt jeweils mit einem Kreuztisch von links nach rechts und von oben nach unten bewegt werden konnte. Flüssigkeitskulturen, wie sie *Burgert* (hängende Tropfen) und *Brown* (liegende) verwandt haben, waren nicht anwendbar, da die Sporen, gleichgültig ob gekeimt oder nicht, einmal leicht hätten wegschwimmen können, so daß ich die einen mehrmals, die anderen nie beim Zählen erfaßt hätte, und weil sie zweitens sich in ganz verschiedener Höhe der Flüssigkeitsmenge befunden haben würden, was das Zahlen erschwert und eine zusätzliche Fehlerquelle bedeutet hätte. Immerhin habe ich auch eine Reihe qualitativer, orientierender Versuche in hängenden Tropfen ausgeführt.

Grundsätzliches zur Keimung. Als gekeimt betrachte ich jede Spore, aus der eine Keimblase ausgetreten ist. Mag diese noch so klein sein, sie ist immer mindestens als stark lichtbrechender Punkt erkennbar. Ob eine Hyphe oder gar Mycel gebildet wird, ist ohne Bedeutung für die Entscheidung, ob eine Spore gekeimt hat oder nicht. Es ist grundsätzlich zu unterscheiden zwischen Keimung und Wachstum: Die „Keimung" ist *kein* Dauerzustand, sondern ein einmaliges Geschehen, an das sich das Wachstum anschließt.

Zuerst haben *Uber* und *Goddard* (1934) diese Unterscheidung gemacht, die bei ihren Untersuchungen „. . . on the x-ray survival curves of *Neurospora*" fanden, daß immer stärkere Röntgenstrahlendosen das Wachstum des Mycels erst gar nicht, dann immer mehr und schließlich ganz verhinderten, während die Keimung nicht aufgehoben wurde. Noch mit 150000 R bestrahlte Sporen bildeten kurze, geschwollene Keimschläuche, deren Plasma aber koaguliert war. Die Sporen waren also tot. *Uber* und *Goddard* kommen daher zu dem Schluß, daß Keimungskurven unter Bestrahlungseinfluß den Ablauf bestimmter physikalischer Veränderungen im nicht lebenden System darstellen (!). Hier handelt es sich natürlich um einen Grenzfall physikalischer Beeinflussung. Der Zweck meiner Versuche war jedoch, die Keimung als Ausdruck der *Lebens*energie zu fördern. Fälle von lethaler physikalischer Wirkung, die nach dem eben Zitierten eine künstliche Keimung der toten Sporen hervorrufen konnte, waren deshalb auszu-

schließen. Immerhin kann ich bestätigen, daß solche Artefakte vorkommen. Denn auch ich fand gelegentlich in starken Säurelösungen Sporen, die einen Keimschlauch von Sporenlänge getrieben hatten, aber zweifellos tot waren.

Der von *Uber* und *Goddard* berichtete Fall von „Keimung“ ist ein krasses Beispiel für die Auffassung, die sich mir auf Grund meiner Versuche förmlich aufdrängt, daß die Keimung überwiegend von physikalischen und nicht von chemischen Wirkungen abhängt und somit grundverschieden vom Wachstum ist. „No relationships seem whatsoever to exist between germination and growth, other than that the former is necessarily a prerequisite of the latter“ (*Uber* und *Goddard*). Dieser Auffassung entsprechen auch die Ergebnisse von *Nielsen* und *Hartelius* (1933), nach denen Konidien von *Aspergillus niger* bei niedrigerem p_H keimen konnten, als das Mycel zu wachsen imstande war. Auch *Schmucker* (1935), der den Borsäureeinfluß auf die Keimung von Nymphaeenpollen untersucht hat, hält es für „durchaus möglich“, „daß Pollen*keimung* und Schlauch*wachstum* zwei recht verschiedene Dinge sind.“ Und *H. vom Berg* (1930) bemerkt, daß die Beeinflussung von Pollenkeimung und Schlauchlänge „keineswegs parallel gehen“.

Vorversuche. Die Vorversuche wurden ausgeführt in am Deckglas hängenden Tropfen auf durchbohrtem Objektträger mit untergelegtem gewöhnlichem Objektträger, so daß geschlossene feuchte Kammern entstanden. Diese standen zu zweit auf Glasklötzchen in *Petri*-Schalen von 10 cm Durchmesser. Bei diesen Versuchen gab es durchweg keine Keimung, weil Sauerstoffzutritt, Durchlüftung und Verdampfungsmöglichkeit ungenügend waren. Dieselben Versuche wurden dann unter Weglassung des Unterglases ausgeführt. Die feuchte Kammer war jetzt die *Petri*-Schale. Die Sporen wurden trocken mit „Platinit“-Draht von der Glaswand des Kulturröhrchens abgekratzt und in Tropfen destillierten Wassers eingetragen. Es erfolgte keine Keimung. Daß Sporen fäulnisbewohnender Pilze in reinem Wasser fast alle nicht keimen, ist schon von *Duggar* (1901) bemerkt worden, der als Ausnahme *Oedocephalum albidum* anführt. Auch in reinem Glycerin oder in verschiedenen Verdünnungen davon gab es keine Keimung, ebensowenig in 1%iger Calciumnitratlosung, die sich bei *Ustilago*-Sporen bewährt hat (*Kirmsse*). Schließlich sah ich in *Hägelund-Almoslechner*scher Nährlösung [*Almoslechner* (1934)] ab und zu ein paar Keimungen, aber nur, wenn Bakterien dabei waren. Bei Versuchen in derselben Nährlösung mit Zusatz von 0,5 % Asparagin ergaben sich Schwierigkeiten. Da die besagte Nährlösung ein hervorragender Nährstoff für Mikrobionten aller Art ist, mußte sie keimfrei gemacht werden, was ohne Asparagin leicht gelingt. Bei Zusatz von Asparagin wird aber die Lösung beim Kochen unter 3 Atm. Druck gelb, flockig und trübe, so daß sie unverwendbar ist. Nur wenn die Nährsalze und Asparagin getrennt gelöst, die Lösungen zusammengegossen und kurz und kräftig keimfrei gekocht wurden, blieb die Lösung klar, wurde aber tief burgunderrot.

Mit der entkeimten *Almoslechner*-Lösung mit Asparagin wurden 15 Versuchsreihen durchgeführt. Manchmal keimten die Sporen, manchmal nicht, einmal wurde sogar 45,5 % Keimung gezählt in einer keimfrei gebliebenen Kultur, aber leider traten meist Bakterien und Lufthefen auf und hemmten die Keimung sichtlich. Diese Hemmung tritt, wie es scheint, in feststehendem Maße auf, d. h. die Keimprozente sind je nach der Art des Kleinlebewesens und nach seiner Menge immer um fast gleiche Sätze herab-

gemindert, entsprechend den Ergebnissen *Porters* (1932), nach dem ein bestimmtes Bakterium in gleicher Menge einen bestimmten Pilz gleich schädigt. Diese Schädigung ist von Bakterium zu Bakterium einerseits und von Pilz zu Pilz andererseits verschieden.

Auffallend war ein Einfluß der Größe des Tropfens: Öfter keimten Sporen am Rande des Tropfens, in der Mitte dagegen nicht. Wie sich ergab, hängt das nicht mit einem Ansteigen der Nährsalzkonzentration von der Mitte nach dem Rand zu zusammen, wie *Duggar* (1901) annimmt, sondern beruht auf der bemerkenswerten Eigenschaft der Sporen, gern im Gebiet eines Feuchtigkeitsgefälles zu liegen, aber nicht zu keimen, wenn sie völlig vom Wasser benetzt sind oder sich im dampfgesättigten Raum befinden, und erst recht nicht, wenn sie schwimmen. Das ist aber in einem hängenden Wassertropfen leicht der Fall, wenn die Sporen nicht an der nach unten gerichteten Oberfläche hängen. Besser keimten auch Sporen an der Glasfläche, wenn der Tropfen durch Stoß oder infolge Zuschwerwerdens durch dazukommendes Kondenswasser abgefallen oder weggelaufen war.

Keimbedingungen. Folgender Versuch entschied mein weiteres Vorgehen[1]: Sporen in hängenden Tropfen der *Hägelund-Almoslechner*-Lösung mit Asparagin hatten nach $7^1/_2$ Stunden, nach welcher Zeit die Sporen gekeimt haben sollten, in einem Thermostaten mit 30° C und 85 bis 98 % Feuchtigkeit sämtlich nicht gekeimt. Daraus schien hervorzugehen, daß gerade das Verdampfen des Wassers wichtig ist, das bei 85 bis 98 % Feuchtigkeit sehr herabgesetzt ist. Dann wäre auch für die schlechte Keimung in den kleinen feuchten Kammern die Ursache wohl nicht nur in einem Mangel an Sauerstoff, sondern auch in einem solchen an Verdampfungsraum zu suchen. Damit war klar, daß bei der Arbeit mit den nie genau festlegbaren Tropfen keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden konnten.

Gefordert werden mußte eine Arbeitsweise, bei der es möglich war, ein einheitliches Zählergebnis zu bekommen, bei der eine übersichtliche Verteilung der Sporen und vor allem ein feststehendes Verhältnis gekeimter und nicht gekeimter Sporen gewährleistet war. Diese Arbeitsweise zu ermitteln, war nicht gerade einfach, ist auch nur näherungsweise gelungen, weil eine Unmenge von Kleinstbedingungen die hochempfindlichen Sporen maßgebend zu beeinflussen vermag. Das haben übrigens viele Forscher gefunden, die keimphysiologisch gearbeitet haben, z. B. *Hoffmann* (1860), *Duggar* (1901), *Wilcoxon* und *Mac Callan* (1934), *Gi͂rzitska* (1933) und *Hassebrauk* (1932), die über bemerkenswerte „Schwankungen" oder „individuelle Verschiedenheiten" der Keimung klagen. Auch sonst werden ab und zu mehr oder weniger erklärte „Imponderabilien" angeführt, die die Keimung in einer meist nicht gewünschten Richtung beeinflussen [Übersicht bei *Fischer-Gäumann* (1929)]. Ich habe dieselben oft unerklärlichen Schwankungen der Keimung erlebt. Offenbar ist das, was man allgemein als Keimung

[1] Für die Erlaubnis, im Institut für die physikalischen Grundlagen der Medizin einen besonderen Thermostaten für meine Zwecke zu benutzen, danke ich Herrn Professor Dr. *Rajewsky* verbindlichst.

bezeichnet, das Austreten einer Keimblase oder eines Keimschlauches, von sehr vielen, im Versuch nicht zu übersehenden Versuchsbedingungen abhängig.

Zu den wichtigsten Gruppen von Bedingungen zählen Einflüsse des Lichtes, der Temperatur und der Feuchtigkeit. Da ich mich bemüht habe, die beiden ersten Faktoren tunlichst gleich zu halten, bleibt als zweifellos größte Fehlerquelle meiner Versuche die relative Feuchtigkeit.

Genaue Versuche über die Abhängigkeit der Keimung von der Luftfeuchtigkeit hat *K. Rippel* (1933) an *Cladosporium*- und *Botrytis*-Arten ausgeführt, deren Konidien er trocken auf Uhrgläser aussäte und in Exsikkatoren mit genau eingestellter Feuchtigkeit bei verschiedenen Temperaturen 10 Tage stehen ließ. Bei 100 % Feuchtigkeit keimten 100 %, unabhängig von der Temperatur, so daß nach *Rippel* 100 % F. einem Quellungsoptimum der Sporenmembran entsprechen dürften. Bei manchen *Puccinia*-Arten beispielsweise scheint das aber noch nicht auszureichen, da in Wasser wesentlich mehr keimen als in dampfgesättigter Luft [*Hemmi* (1934)]. Auch spielt jedenfalls der Sauerstoffverbrauch eine Rolle, der von Pilz zu Pilz verschieden ist [*Doran* (1922)]. Es ist anzunehmen, daß Sporen sauerstoffbedürftiger Pilze selbst in Wasser nicht keimen werden, wenn nicht die Durchlüftung die nötige Sauerstoffmenge herbeischafft. Das dürfte bei *Bombardia* der Fall sein, die auf Durchlüftung deutlich reagiert. Solche Fragen der Beeinflussung der Sporenkeimung, unter anderem auch durch Durchlüftung, hat *Doran* an Sporen oder Konidien von acht verschiedenen Pilzen untersucht und eine Fülle von Material aus der Literatur gesammelt. Besonders betont er die bis heute noch nicht erklärten Einflüsse, die Sporen gleicher oder verschiedener Art aufeinander und Pilzmycelien untereinander ausüben. Während *Porter* und *Brown* die gegenseitige Beeinflussung von Sporen, Pilzen oder Bakterien als Schädigung bezeichnen, läßt *Doran* das noch offen.

Arbeitsverfahren. Nach langen Ermittlungen erwies sich schließlich folgende Arbeitsweise als brauchbar:

1. Als Kontrolle wurden 8 bis 10 ccm heißer Lösung von 4 % technischer Maltose (*Merck*) und 4% Agar in destilliertem Wasser in *Petri*-Schalen von 8 cm Durchmesser gegossen. Im Versuch wurde entweder die Säure in fester Form genau abgewogen und in der entsprechenden Menge destillierten Wassers gelöst, oder aber die Säure wurde in Lösung in der gewünschten Weise verdünnt. Dies geschah immer mit Voll- und Maßpipetten und wurde vorher so berechnet, daß Agar und Maltose stets 4%ig blieben. War die Agarplatte erkaltet und fest geworden, galt sie als gebrauchsfertig für den Versuch.

2. Von der in der oben angegebenen Weise erhaltenen Sporenaufschwemmung wurde in jeder Schale 1 ccm (anfänglich in ein paar Versuchen 1,5 oder 2 ccm) auf der ganzen Agaroberfläche gleichmäßig verteilt.

3. Die so fertiggestellte Kultur wurde in einen Glasschrank von 80 × 80 × 60 cm gestellt. Die Schalen standen auf einer waagerechten Spiegelscheibe, zu der im Winkel von 50° eine zweite Spiegelscheibe angebracht war. Der Glaskasten stand an einem Nordfenster. Er wurde elektrisch geheizt und mit einem Quecksilber-Thermoregulator auf 24 ± 1° C gehalten. Die relative Feuchtigkeit konnte nicht konstant gehalten werden. Selbst-

verständlich stieg sie, wenn ich ein Dutzend Schalen mit je 1 ccm Aufschwemmungswasser hineinstellte, um nach völligem Verdampfen langsam wieder abzusinken. Um nämlich ein dauerndes Steigen der Luftfeuchtigkeit zu vermeiden, hatte ich Schalen mit konzentrierter Schwefelsäure, die von Zeit zu Zeit erneuert wurde, im Kasten verteilt. Weil aber der Kasten zu groß war, konnten die Bedingungen in ihm nicht willkürlich gestaltet werden. Die Versuche wurden gegen Abend angesetzt, verblieben hierauf 12 bis 15 Stunden im Kasten, wurden dann herausgeholt und ausgezählt oder, wenn ein sofortiges Auszählen nicht möglich war, mit einer 5 %igen Formaldehydlösung abgetötet (fixiert).

Agar und andere Keimböden. Gern würde ich näher eingehen auf die Entkeimung, auf das Kochen des Agars, das Agar selbst und seine Verwend- und Ersetzbarkeit im Bereich meiner Versuche. Die Entkeimung geschah stets bei 3 Atm. im Dampftopf. Bei den Säureversuchen mit Agarnährboden brauchte durchweg nicht entkeimt zu werden, weil vom Kochen des Agars bis zum Ende des Versuchs meist nur etwa 15 bis 20 Stunden vergingen, während welcher Zeit keine Hefe und kein Schimmelpilz zur Entwicklung kommt, höchstens und selten einmal ein Bakterium vom „*spreader type*“ [*Porter* (1932)], was man bei sauberem Arbeiten im allgemeinen verhindern kann. Das Agar mit der Maltose und mit dem Zusatz von Säure wurde mit der entsprechenden Menge destillierten Wassers in *Erlenmeyer*-Kolben von, je nach der gebrauchten Menge, 100 bis 300 ccm, im Wasserbad schwimmend, so lange erhitzt, bis es dünnflüssig und moglichst klar war, und wurde dann schnell zu Platten gegossen. Das Kochen auf dem Wasserbad dauerte 5 bis 10 Minuten: Je mehr Saure mitgekocht wurde, desto schneller, leichter und vollständiger verlief der Kochvorgang, je weniger darin war, um so langsamer und unzulanglicher.

Auf viele eigene Beobachtungen und auf fremde Angaben über Agar aus der sehr verstreuten Literatur, die jeden mit Agar arbeitenden interessieren, kann ich leider nicht näher eingehen. Oft ist mir die schon äußerlich wahrnehmbare Unreinheit und Ungleichmäßigkeit des handelsüblichen Federkielagars aufgefallen. Die bei *Itano* (1934), *Fellers* (1916) und *Pringsheim* (1924) angeführten Methoden zur Agarreinigung, die auf ein nachdrückliches Waschen in verschiedener Weise, teilweise mit Säuren hinauslaufen, sind nicht nur mehr oder minder schwierig und umstandlich, sondern auch nicht ganz einwandfrei, insoweit sie zum Teil das Agar chemisch angreifen (Säuren). Gründliches, wochenlanges Wässern und Waschen allenfalls noch Kochen und Ausfällen mit Alkohol oder Aceton, bewirken eine chemisch nicht angreifende Reinigung, wobei beim gereinigten Produkt die Koagulationsfähigkeit noch fast auf das Doppelte gestiegen ist (*Itano*). Herr Dr. *Itano* in Kurashiki, Japan, war so liebenswürdig, mir von seinem Agar oberster Wertstufe (first grade agar) eine Probe zu schicken[1]. Dieses Agar läßt sich leicht kochen und gibt ein völlig ungetrübtes, wasserhelles, glattes Gel, auf dem sich Sporen ausgezeichnet zählen lassen. Für meine zahlreichen Versuche reichte die Probe freilich nicht aus, und da es mir zu zeitraubend war und vor allem nicht durchaus notwendig schien, solche Reinigung durchzuführen, benutzte ich das Agar, wie es war, mußte freilich Unreinheiten im mikroskopischen Bild und etwaige Fehler im Keimungserfolg in Kauf nehmen. Immerhin kam ich im Laufe meiner Versuche zu

[1] Dafür möchte ich ihm an dieser Stelle nochmals verbindlichst danken.

der Ansicht, daß derlei Fehler vollauf ausgeglichen werden durch die große Zahl von Versuchen und ausgezählten Sporen.

Trotz nicht zu verkennender Mängel und Ungenauigkeiten nicht gereinigten Agars war es doch der einzige Keimboden, der in Frage kam. Gelatine ist noch viel weniger chemisch definierbar als Agar und enthält soviel Elektrolyte, daß bei ihrer Verwendung ein Zuwachs der ohnehin zahlreichen unbeurteilbaren Versuchsfehler unvermeidlich gewesen wäre.

Ferner sind mir von der Firma *Kalle & Co.* in Wiesbaden-Biebrich Proben Cellophan in verschiedener Stärke und verschieden starke Celluloselösungen (Tylose) in Methylenchlorid-Methanol zur Verfügung gestellt worden[1]. Cellophan konnte nicht gebraucht werden, weil es so stark strukturiert ist, daß das Zahlen im Mikroskop ungemein erschwert wird, zumal der Lichtdurchtritt bei solcher Dicke des Cellophans, wie sie nötig wäre, damit die Membran sich nicht bei der Quellung wellt, bereits stark gehemmt ist. Membranen aus Tylose sind leider auch ausgeschlossen; man bekommt sie nicht glatt, und außerdem keimen die Sporen überhaupt nicht darauf, weil schon Spuren Methylenchlorid die Keimung verhindern. — Kieselsäuregel ware zweifellos als Boden für solche Versuche hervorragend geeignet, wenn man es beispielsweise nach der bei *Pringsheim* (1924) angegebenen Vorschrift herstellt, und hätte manchen Vorzug: Es ist immer völlig klar und glatt, also zum mikroskopischen Zählen ideal, und man hat keine Verunreinigungen zu befürchten. Es vollständig zu entsauern bis zur neutralen Reaktion, erfordert aber langes, wiederholtes, sorgfältiges Wässern. Dadurch wird seine Herstellung so umständlich und zeitraubend, daß ich auf seine Verwendung verzichten mußte. Den Vorzug hat dem Kieselgel gegenüber das Agar, daß es, wie mir viele Stichproben gezeigt haben, immer neutral ist (Untersucht mit „Pehavi", p_H-Bestimmungsapparat der *Hartmann & Braun* A.-G. mit Chinhydronelektrode).

Versuche.

Bei meinen Versuchen ging ich aus von der β-Indolylessigsäure, mit der ich auch die meisten Versuche angestellt habe. Es war natürlich von Interesse, ob sich eine stimulierende Wirkung feststellen ließ. Da sich alsbald ergab, daß die Menge gekeimter Sporen im Versuch bei einem bestimmten Säurezusatz wohl über der Kontrolle oder mindestens ebenso hoch liegen konnte, lag es nahe, auch die Essigsäure auf ihre Wirkung zu prüfen und ein paar andere Säuren, von denen keine besonderen Wuchsstoffeigenschaften bekannt sind. Unter diesen habe ich vorzüglich mit Wein- und Maleinsäure gearbeitet.

Weil es gelungen war, längere Zeit einen Kontrolldurchschnitt gekeimter Sporen von 40% zu halten, konnte ich 3 Monate lang täglich mit einem gewählten Säurezusatz eine Reihe Versuche ansetzen nebst einigen Kontrollschalen und dann die an verschiedenen Tagen erhaltenen Ergebnisse in einer Kurve vereinigen. Ganz befriedigen kann indessen dieses Verfahren nicht. Die Kontrollen ergaben mit der Zeit, wenn ich alle zusammenstellte, eine steil verlaufende *Gauß*sche Fehlerkurve mit einem hohen Maximum.

[1] Wofür ihr auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Wenn die Kontrolle aber einmal einen weit außen liegenden Wert aufweist, fragt es sich, ob der im dazugehörigen Versuch erhaltene Wert sich ohne weiteres in der Kurve für die betreffende Säure verwerten läßt. Lange habe ich indessen die Versuche in der genannten Weise einzeln ausgeführt, bis schließlich die Kontrollwerte plötzlich (nach vierwöchiger Unterbrechung der Versuche) nicht mehr unter 60 % zu bringen waren und gelegentlich sogar auf 80 bis 90 % stiegen. Das war unerwünscht. Übrigens erwähnt auch *E. G. Pringsheim* (1914) ähnliche Vorkommnisse und meint, man solle zeitlich weit auseinander liegende Versuche nicht vergleichen. Da die großen Schwankungen der Kontrollen nicht zu vermeiden waren, ging ich dazu über, jeweils neunmal je drei Versuchsschalen mit dem gleichen Säurezusatz und drei Kontrollen, zusammen 30 Schalen, anzusetzen. Daraus erhielt ich für einen Durchschnittskontrollwert aus drei Schalen eine Kurve aus neun Punkten, deren jeder auch den Durchschnitt aus drei Versuchen darstellt. Für die genauere Bestimmung einzelner Punkte wurden die Versuche, je nachdem, ob das Ergebnis des Versuchs eindeutig war oder nicht, mehrfach wiederholt. Wenn weniger Punkte interessierten, wurden fünfmal fünf oder viermal sechs Schalen mit den entsprechenden Kontrollen angesetzt. So ist nach zahlreichen Wiederholungen die Gesamtdurchschnittskurve für die β-Indolylessigsäure (Abb. 7, S. 342) entstanden.

Das große Zahlenmaterial, das ich in den vielen Einzelversuchen erhielt — es wurden insgesamt über 600000 Sporen auf ihre Keimung untersucht —, will ich hier nicht bringen. Beim Vergleich mit den Ergebnissen der Serienversuche zeigt sich, daß die Kurven, die aus den Einzelwerten zustande kamen, gut den Serienwerten und den Wiederholungen entsprechen. Bei den Einzelversuchen — und überhaupt — besteht bei meiner Versuchsanstellung die Gefahr, daß man eine große Menge Sporen zählt, aber unter mangelhafter Berücksichtigung der Anzahl der Versuchsschalen. Bei den Serienversuchen, insbesondere mit β-Indolylessigsäure, habe ich durch entsprechende Wiederholungen der Versuche dem Rechnung zu tragen versucht.

Vor der Besprechung der Versuche (s. Kurven) muß ich noch erwähnen, daß in den früheren Einzelversuchen in jeder Schale etwa 500 bis 800 Sporen gezählt wurden, in einigen Fällen weniger (200 bis 500) oder mehr (bis 1000). In den Serienversuchen waren die Zahlen ausgeglichener und beruhten durchschnittlich auf 700 bis 900 gezählten Sporen.

Natürlich war gleichmäßig verteilte Lage der Sporen erwünscht. Das konnte ich leider nicht willkürlich beeinflussen, zumal das unbewehrte Auge die Sporen nicht sehen kann. Liegen die Sporen in dichten Klumpen, also dreidimensional, beieinander, kann man gekeimte und nicht gekeimte selbstverständlich nicht zählen. Liegen sie flächenhaft dicht, Spore bei Spore, so kann man meist auch nicht zählen, aber überblicken, ob überhaupt Sporen gekeimt haben, und gegebenenfalls schätzen. Liegen nur 20 bis 40 ziemlich dicht, so kann man oft zählen und kommt zu folgendem sonderbaren Ergebnis: Gleichgültig, wie der Versuch ausgefallen ist, findet man manchmal Gruppen, wo alle gekeimt haben, und andere, wo nicht eine Keimblase da ist, und das oft in einer

und derselben Schale. Durchweg läßt sich sagen, daß die Sporen besser keimen, wenn sie allein liegen, wie auch *Duggar* (1901) bereits beobachtete. Demnach muß die Sporendichte von Einfluß sein. In der Tat zeigt sich eine unerwünscht fein abgestufte *Abhängigkeit der Keimung von der Aussaatdichte.* Keine Versuchsreihe habe ich wiederholt, in der nicht auffiel, daß bei steigender Sporenaussaatdichte weniger Sporen keimten. Da ich bei meiner Methode der Aufschwemmung von Sporen deren Aussaatdichte nicht von mir aus festsetzen konnte, blieb mir nichts anderes übrig, als immer möglichst *Bombardia*-Kulturen zu wählen mit schätzungsweise gleichem Sporenertrag, ferner gleiche Mengen Wasser in jedes Röhrchen zu füllen und von der Aufschwemmung immer 1 ccm in jede Schale zu pipettieren. Weil die Erfahrung diese genaue Abhängigkeit gelehrt hat, fallen die Schwankungen der Kontrolle auch nicht so ins Gewicht, wie es zunächst erscheint. Bei Wiederholungen mit verschiedener Sporenaussaatdichte zeigte sich mehrfach, daß die Wirkung des Säurezusatzes fast gleich bleibt, die verschiedenen Werte einander also annähernd proportional sind, was erstmalig *Brown* (1922) statistisch sichergestellt hat bei seinen Untersuchungen über die Wirkung von Sauerstoff und Kohlensäure auf die Keimung der Konidien von *Botrytis cinerea.* Bei diesem Pilz stieg die Keimung in bestimmten Fällen von 0 auf 98 %, wenn die Aussaatdichte einmal m und das andere Mal m/100 betrug. Bezüglich der Sporen von *Bombardia lunata* kann ich das be tätigen; es wurden zwar keine Sprünge von 0 auf 98 % Keimung beobachtet, aber die Unterschiede in der Dichte waren auch nie so groß wie bei den *Brown*schen Versuchen. Auch von *Edgerton* (1910) wurden derlei Beziehungen beobachtet. Eine wirkliche Proportionalität in Versuchen mit verschieden hoher Kontrollkeimung ist freilich ausgeschlossen. Das ist natürlich, denn je höher die Kontrolle liegt, desto unwahrscheinlicher ist, daß noch eine Förderung eintritt. — Der Keimhundertsatz der Kontrolle ist, von den vielen äußeren Einflüssen abgesehen, der Ausdruck für die Lebenskraft der Sporen: Ist diese sehr groß, so sind die Sporen weniger leicht zu schädigen, aber es ist auch weniger wahrscheinlich, daß etwas sie noch stark fördern kann. Ein gewisser Hundertsatz von Sporen ist überhaupt keimunfähig. Daher nähert sich beim Ansteigen von 90 auf 100 % Keimung die Zahl der wirklich keimenden immer mehr der Zahl der überhaupt keimfähigen Sporen. Ist die Lebenskraft dagegen klein, so sind größere Mengen Nährstoff erforderlich, um eine Förderung zu erzielen. Daher scheint das Maximum der Kurve aller Säuren, besonders aber solcher, die überwiegend Nährcharakter (s. S. 339 f.) haben, bei sinkenden Kontrollwerten in den Bereich höheren Säuregehalts (im Kurvenbild nach links, z. B. bei der Maleinsäure) zu rücken. *Pringsheim* (1914) bekommt ein gleiches Ergebnis bei Versuchen mit ab-

gestufter Stickstoffmenge bei *Aspergillus niger* und drückt es so aus: „Bei Verbesserung der sonstigen Lebensbedingungen oder Verringerung der Menge eines Nährstoffes wird dieser im Minimum vorhandene immer besser ausgenützt." Der „Verbesserung der Lebensbedingungen" entspricht bei mir eine hohe Kontrolle, dem „im Minimum" vorhandenen Nährstoff die Säure. Damit stimmen sowohl die beiden Maleinsäurekurven untereinander wie die Essigsäurekurve und eigentlich alle meine sonstigen Kurven überein, wenn man die verschiedene Höhe der Kontrollen betrachtet. Ist die Keimkraft als Funktion der endosmierenden Säuremenge klein, so kann sie erhöht werden durch Zusatz von Stoffen mit geeignetem Verhältnis von Reiz- und Nährwert. Hier füge ich gleich hinzu, daß der „Reizwert" die Summe einer ganzen Reihe von Eigenschaften des Zusatzstoffes bildet. Als solche Eigenschaften können u. a. etwa in Betracht kommen die elektrolytische Dissoziation, das Diffusionsvermögen, der von der Menge abhängige osmotische Druck, aber auch die Oberflächenspannung. Je nach Menge und Verteilung dieser Eigenschaften kann der daraus zusammengesetzte „Reizwert" eine Schädigung oder eine Förderung bewirken. Insofern kommen die Anteile der Reizmenge an Förderung und Schädigung in den wirklichen Mengen des zugesetzten Stoffes zum Ausdruck. Denn das Verhältnis von positivem zu negativem Wirken in einem Reizstoff ist ja natürlich immer gleich, aber die Fähigkeit des fördernden Reizes, den Pilz zum Angriff unausgenützter Nährstoffe oder -werte zu befähigen, verschafft ihm einen viel größeren Wirkungsgrad als dem schädigenden Reizanteil. In diesem Zusammenhang ist auch *Duggar*s Feststellung verständlich, daß neutrale Salze eher als saure stimulieren können.

Wenn ich von Nährwert rede, so ist damit der tatsächliche Nähreffekt gemeint, der dadurch zustande kommt, *daß* und *wie* der Pilz den Stoff assimiliert. Selbstverständlich spielen dabei die Enzyme die Hauptrolle. Somit hat ein Stoff für verschiedene Pilze einen verschieden hohen Reiz- und Nährwert: Für einen Pilz mit sehr vielen Enzymen kommen bedeutend mehr Stoffen Nährwerte zu und weniger Reizwerte als für einen enzymarmen Pilz, der gegen eine Welt von Schädigungen sich behaupten und sich kümmerlich von den wenigen Nährwerten, die ihm erschließbar sind, nähren muß. In diesem Sinne sind wohl auch die Befunde von *Nielsen* und *Hartelius* (1933) zu verstehen, nach denen *Aspergillus*-Konidien unter $p_H = 1,5$ nicht mehr keimen konnten, bei Zusatz von Wuchsstoff B dagegen noch bei $p_H = 1,3$. Ganz ähnlich sah *Webb* (1921) die gleichen Konidien, die ohne Zusatz bis $p_H = 2,1$ keimten, bei Zusatz von — möglicherweise wuchsstoffhaltigem — Zuckerrübensaft bis $p_H = 1,5$ keimen. In beiden Fällen hat man sich also vorzustellen, daß der zugesetzte Wuchsstoff B bzw. Zuckerrübensaft anteilgemäß assimiliert, dadurch die Ernährungslage gebessert und die Widerstandskraft gehoben wird. Und wenn diese höher ist, wird erst eine noch saurere Lösung das Sporenplasma am Auskeimen hindern können.

Bei Säuren mit überwiegendem Reizcharakter wie der β-Indolylessigsäure rückt das Maximum der Kurve weniger leicht in den Bereich höheren Säurezusatzes, aber die Empfindlichkeit gegen den Reiz steigt mit sinkenden Werten der Kontrolle. Dies erwies sich mir das erstemal am auffallendsten: Die Einzelwerte der β-Indolylessigsäure, die anfänglich bei niederen Kontrollwerten (zwischen 30 und 40 %) erhalten worden waren, ergaben eine Kurve, die mit 0 % Keimung bei 0,05 % Säurezusatz begann, bei 0,03 % schon 71 % erreicht hatte und bei 0,005 % wieder am Kontrollwert angekommen war. Selbstverständlich gilt das ebenso für den Reizwertanteil von Nährsäuren (s. S. 339). In Übereinstimmung hiermit fand *Schmucker* (1935), daß die Keimung der Konidien von *Phycomyces Blakesleeanus* um so stärker gehemmt wurde, je geringer der Malzgehalt des Mediums war.

In den Versuchen mit den verschiedenen Säuren kehrten die gleichen Keimbilder immer wieder. Deshalb will ich gleich auf die Kurven Bezug nehmen.

Im Gegensatz zur Kontrolle bewirken alle Reize eine Verlangsamung der Entwicklung. Je näher die Lebensbedingungen dem Optimum sind, desto schneller gehen Keimung und Wachstum vor sich [*Doran* (1922)]. Darum sieht man nach der gleichen Zeit bei schädigenden Reizen immer jüngere Stadien: 0,096 % Essigsäure und 0,05 bis 0,035 % β-Indolylessigsäure zeigen nur Keimblasen. Diese haben gewöhnlich einen Durchmesser von ein Fünftel bis ein Viertel der Sporenlänge, also wenn man diese durchschnittlich zu 15 μ annimmt, von 3 bis 4 μ. Abnorme Keimblasen von 10 bis 15 μ Durchmesser kommen dann vor, wenn die Säure als ausgesprochener Nährstoff wirkt, die spezifischen Säureeigenschaften — offenbar nicht der p_H-Wert allein — aber das Hyphenwachstum hemmen. Wenn diese Hemmung zum Teil überwunden ist, gibt es verschiedene Zwischenformen: Der Keimschlauch wird knollig, kurz und dick. Er sieht aus wie eine Kette von Blasen, also darmartig, so bei 0,075 und 0,067 % Weinsäure. Solche Formen sind schon öfter beschrieben worden. So fand *Kirmsse* (1924), daß Sporen von *Ustilago hordei*, die 5 Minuten lang mit 0,2 % Formaldehyd gebeizt worden waren, Riesenzellen mit übergroßen Vakuolen bildeten. *Lopriore* (1895) beobachtete ein kurzes, geschwollen aussehendes Mycel bei *Mucor*-Sporen unter dem Einfluß von 60 und 80 % Kohlensäure, und *Brown* fand dasselbe bei *Botrytis*-Sporen, wenn sie in einer Atmosphäre mit 50 oder 60 % Kohlensäure keimen mußten. Riesige Keimblasen und darmartige Hyphen kommen aber nur vor, wenn die Ernährung der Spore durch den Säurezusatz beeinflußt wird. Bei Säuren mit überwiegendem Reizcharakter, wie bei der Essigsäure und der β-Indolylessigsäure, gibt es derartige Anomalien nicht.

Eine Versuchsserie mit *Essigsäure* (Ergebnis des Keimungsversuchs s. Abb. 1) ergibt folgende Keimbilder: Bei 0,96 % keine Keimung; bei 0,096 % nur Keimblasen; bei 0,07 % Keimblasen und Dreieckstadien, vereinzelte Hyphen bis zu drei Sporenlängen; bei 0,048 % dasselbe ohne Keimblasen; bei 0,034 % Mycel von vielen Sporenlängen, keine Wachstumshemmung; bis 0,01 % immer kräftigeres Wachstum, und von 0,005 % bis 0,001 25 % Wiederabfallen der Mycelbildung.

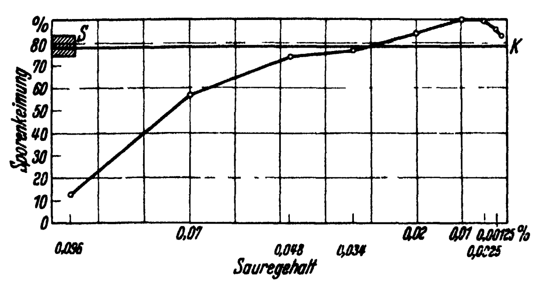


Abb. 1. Kurve einer Serie mit Essigsäure. *K*· Kontrolle. *S*. Streuung der Kontrolle. Temperatur wahrend der Versuche. 24 bis 25° C. Feuchtigkeit. 55 bis 57 %.

Bei der *β-Indolylessigsäure* (Ergebnis von Keimver. uchen s. Abb. 2) ist es ähnlich: 0,1 % erlaubt keine Keimung; bei 0,07 % haben ein paar Prozent Sporen mit Keimhyphen von zwei Sporenlangen gekeimt; die Schlauche solcher Sporen wachsen auf saureloser Unterlage nicht weiter und sind als tot zu betrachten, wie es der Auffassung von *Uber* und *Goddard* (s. S. 323/324) entspricht: bei 0,05, 0,04 und 0,035 % gibt es nur Keimblasen, bei 0,03 % (s. Abb. 3, S. 334) kommen zahlreiche Dreieckstadien dazu. bei 0,02 % (s. Abb. 4, S. 335) fallen Keimblasen und Dreieckstadien weg, dagegen haben die gekeimten Sporen gut entwickeltes Mycel von etwa 8 bis 12 Sporenlangen, bei 0,01 % bis 20, bei 0,005 % bis 50 Sporenlängen. Bei beiden Sauren setzt somit ziemlich plötzlich von einem bestimmten Lösungsgehalt ab die Mycelbildung ein, wobei auffällt, daß jeweils an dieser Stelle die Keimhundertsätze etwas niedriger liegen als bei dem nächst höheren Lösungsgehalt an Säure.

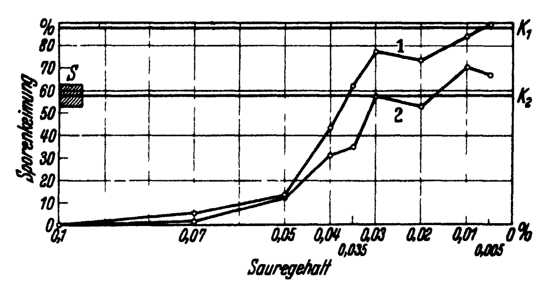


Abb. 2 Kurven zweier Serien mit β-Indolylessigsäure 1 Mit Kontrolle K_1· Da die Streuung nur 0,6 % betrug, ist sie nicht eingezeichnet Temperatur wahrend der Versuche 23 bis 25° C. Feuchtigkeit: 55 bis 60 %. 2. Mit Kontrolle K_2. *S* = Streuung. Wahrend der Versuche herrschten 22,8 bis 24,8° C und 54 bis 63 % Feuchtigkeit.

Ein anderes Bild zeigen die *Malein-* und *Weinsäure.* Vor allem weisen sie ihren überwiegenden Nahrcharakter damit aus, daß 0,1 % Saurezusatz nicht lethal wirkt, und daß wahrscheinlich auch erst ein viel höherer Gehalt an Säure die Keimung verhindert. Wo und wann

immer das geschieht, ist es keine Giftwirkung, die sich in einer Schädigungskurve ausdrückt, sondern eine Wirkung, die durch Störung des normalen Ernährungsverlaufs infolge eines Zuviels an nicht obligatem Nährstoff zustande kommt.

Damit stimmen Versuche von *Pringsheim* (1914) überein, der einen *Saccharomyces* verschieden lange Zeit (10 bzw. 33 Tage) in Lösungen mit verschiedenem Zuckergehalt zog. Dabei stellte sich heraus, daß bei längerer Versuchsdauer der Pilz seinen Nährstoff allmählich immer besser ausnutzte, und daß Ungleichmäßigkeiten verschwanden, daß ferner steigender Zucker-



Abb. 3. Sporenkeimung auf Maltoseagar mit 0,03% β-Indolylessigsäure. Die kleinen weißen Klümpchen sind Spermatien. Etwa 250fach vergrößert.

gehalt nur bis zu einem bestimmten Grad fördernd wirkte (die Hefe war nach 33 Tagen am besten bei 4% Zucker gediehen). Man kann also wohl sagen, je geringer der Reizwert eines Stoffes ist, desto größer sind die Mengen, die zugegeben werden können, ehe eine Schädigung eintritt. In *Pringsheim*s Versuchen ist nur das Wachstum berücksichtigt. Die Versuchsergebnisse mit der Hefe entsprechen aber meinen Feststellungen über die Sporenkeimung.

Die Ergebnisse meiner Versuche mit Wein- und Maleinsäure stimmen mit dem überein, was *Uber* und *Goddard* über die Wirkung der Röntgenstrahlen aussagen: Zunehmende Bestrahlung verhindert schließlich jedes Wachstum; um aber die Keimung auszuschließen, sind

noch hohere Dosen erforderlich. Bei dem Einfluß von Sauren scheint es ebenso zu sein.

Bei Zusatz von 0,1 und 0,07 % Maleinsaure bekam ich in den Serienversuchen deutliche, aber nicht sehr intensive Wachstumshemmung, von 0,06 % ab wurden Keimung und Wachstum gefordert (vgl. Abb 5, S. 336) Das Mycel war uberaus kraftig und schon nach 18 Stunden so stark entwickelt, daß ich nur noch mit Muhe zahlen konnte Die Hyphen erreichen eine schatzungsweise Lange von einigen Hundert Sporenlangen In der Kurve der Einzelversuche haben wir fast



Abb 4 Dasselbe wie in Abb 3, aber bei Zusatz von 0,02 % β-Indolylessigsaure

das gleiche Bild, nur noch ausgepragter[1] Die nicht wegzubringenden Schwankungen der Kontrollen waren hier recht groß, der Durchschnitt betrug aber 44,8 % Die Wachstumshemmung war hier noch etwas starker bei 0,1 und 0,07 %, ebenso die Keimhemmung und auch die Wachstumsforderung bei 0,05 bis 0,014 %, entsprechend dem S. 330/331 Gesagten

Die Weinsaureserien (Abb 6, S. 336) verliefen sehr gleichmaßig, was bei dem zweimaligen Knick auffallig ist 0,1 % Weinsaurezusatz ergab Keimung mit Riesenkeimblasen, 0,075 und 0,067 % ergaben kurzes,

[1] Ganz vergleichbar der Serienkurve ist diese Kurve leider nicht, weil nicht uberall die gleichen Prozentsatze des Sauregehalts ausprobiert wurden.

darmartiges Mycel, unverzweigt oder mit nur wenig Verzweigungen. Bei 0,05 % war die Wachstumshemmung nicht mehr so stark, aber noch deutlich. Ganz schwach gehemmt schien das Wachstum bei 0,04 %, das Mycel war aber normal. Von 0,03 % ab war weder Wachstum noch Keimung mehr gehemmt. Das Mycel war ähnlich wie bei Maleinsäurezusatz sehr kräftig und lang. Auffallend sind die zwei Knicke, die in beiden Serien gleichermaßen auftraten. In der hier nicht wiedergegebenen Kurve der Einzelversuche liegt der Tiefpunkt bei 0,045 % und ist besonders niedrig (37,75 %), während die Werte fur 0,075 und 0,067 % 74,04 bzw. 71,96 %, also rund 36 % mehr betragen.

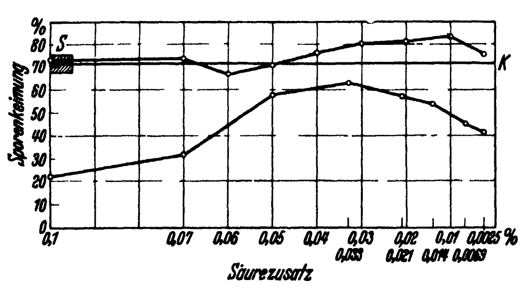


Abb 5. Versuche mit Maleinsaure. Oben die Kurve eines Serienversuchs, dazu K: Kontrolle und S: Streuung der Kontrolle. Unten Kurve aus Einzelwerten bei einem Kontrolldurchschnitt von 44,8 %. Temperatur beim Serienversuch 23,5 bis 25° C. Feuchtigkeit 50 bis 55 %.

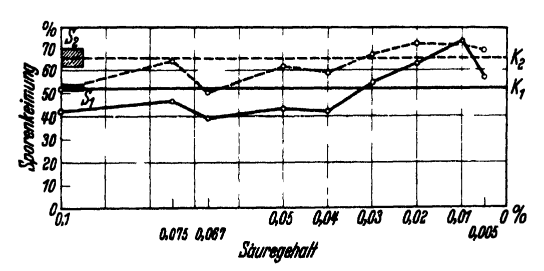


Abb 6. Kurven von zwei Serien mit Weinsaure K_1 und K_2: die zugehorigen Kontrollen. S_1 und S_2: die Streuung der Kontrollen In den Versuchen zu 1 herrschten 23 bis 24° C und 45 bis 50 % Feuchtigkeit, in denen zu 2 23 bis 24° C und 46 bis 58 % Feuchtigkeit Hier und in allen folgenden Abbildungen bedeutet Spkmg : Sporenkeimung

Schließlich habe ich meine Untersuchungen auch auf *Apfelsäure* ausgedehnt. Ich verzichte aber auf Wiedergabe von Kurven, weil sie kein einheitliches Bild liefern. Die Apfelsaure schließt sich in ihrem Nährcharakter der Wein- und der Maleinsäure an und fordert die Keimung in Mengen von 0,02 bis 0,005 %. Die Kurve verlauft aber von 0,1 bis 0,03 % manchmal über, manchmal unter der Kontrolle, so daß keine spezifische Wirkung zu ersehen ist.

Existiert überhaupt eine „spezifische Wirkung"? Oder beruht etwa die Wirkung jeder Säure auf gleichen Eigenschaften, z. B. auf dem p_H und dessen Veränderung bei verschieden großen Zusätzen? *A. Niethammer* (1928) erklärt mit vielen anderen (Literatur s. bei *Niethammer*) die Wirkungen von Stoffen für unspezifisch. Ich kann das Gegenteil nicht beweisen, glaube aber, daß Stoffe insofern spezifisch wirken, als ihre physikalischen Eigenschaften (Diffusion, etwaiger Dissoziationsgrad, Oberflächenspannung, Molekulargewicht und -volumen u. a.) und die Eigenschaften, die sie hinsichtlich ihrer Angreifbar-

keit durch Pilzenzyme haben, verschieden sind. Dem dürften die Kurven entsprechen, in denen der Säuregehalt in Molbruchteilen angegeben ist. *Bortels* (1929), der die biokatalytische Wirkung von Elementen untersucht hat, tritt auch für deren Spezifität ein. Die Meinungen der Autoren sind indessen nicht ohne weiteres zu vergleichen, weil der Begriff „spezifisch" nicht einheitlich definiert ist.

Um festzustellen, ob etwa eine Abhängigkeit der Sporenkeimung vom Säuregrad nachzuweisen ist, habe ich zunächst das p_H kolorimetrisch an Lösungen der Säuren in destilliertem Wasser gemessen. Später wiederholte ich dies bei meinen genaueren Versuchen über die β-Indolylessigsäure und habe die Lösungen dieser Säure in destilliertem Wasser mit dem oben (S. 328) genannten „Pehavi" geprüft. Das Ergebnis war, daß man die *S*-Kurve der Schädigung, wie sie bei den Säuren mit reinem Reizcharakter auftritt, wohl auch auf das p_H zurückführen kann. Wenn also 1 % Essigsäure, Schwefelsäure oder Salzsäure die Keimung verhindern, kann das zweifellos eine p_H-Wirkung sein. Ob das noch bei der β-Indolylessigsäure zutrifft, scheint mir fraglich. Betrachtet man die Gesamtkurve der β-Indolylessigsäure, von der die 0,1 %ige Lösung ein p_H von 4,8 und die 0,01 %ige eines von fast 7 hat, so könnte man direkte Abhängigkeit der Keimung vom p_H annehmen. Vergegenwärtigt man sich aber, daß von 0,07 bis 0,035 % der p_H-Wert nur von 5 auf 5,5 rückt, so scheint der Keimerfolg nicht damit in Einklang zu stehen. Bei gleichen Mengen der Nährsäuren ändert sich das p_H ebenfalls, aber eine unmittelbare Abhängigkeit der Keimung davon ist nicht festzustellen. Schließlich dürfte der überall auffallende Knick der Kurve — bei der β-Indolylessigsäure bei 0,03 bis 0,02 % — nicht auf p_H-Wirkungen zurückzuführen sein, denn der p_H-Wert kann sich nicht diskontinuierlich ändern. Allein auf die Azidität ist dagegen die Erscheinung der Riesenzellen und der Mycelschwellungen zurückzuführen, was auch *Brown* annimmt, wie überhaupt die Azidität vornehmlich, vielleicht auch nur, das Wachstum beeinflußt. [Siehe dazu auch *Schmucker* (1935).]

Die p_H-Wirkung kann auch sonst von großer Bedeutung sein. Z. B. ist die „Lebenskraft" eine Funktion des p_H-Wertes in den Versuchen von *Cruess*, *Richert* und *Irish* (1931), die gefunden haben, daß zur Abtötung von Pilzen, Hefen und Bakterien bei einem p_H von 5 bis 9 mehr Natriumbenzoat, -salicylat, -sulfit oder Kaliumacetat genommen werden muß als bei einem p_H von 2 bis 4,5. Eine ganze Reihe anderer Forscher haben sich außerdem mit der Wirkung des p_H-Wertes auf Wachstum und Keimung befaßt. Dabei sind Ergebnisse herausgekommen, die Schädigungskurven ergeben, und mit denen man keine spezifischen Wirkungen einzelner Säuren erklären kann.

Ergebnisse.

Nach dem soeben Besprochenen ist die Wirkung doch spezifisch und säureeigen. Das einzige, was für den Pilz den Charakter eines Stoffes ausmacht, sind seine Reiz- und Ernährungseigenschaften.

Über Stoffe, die die Ernährung beeinflussende Reize auf Pilze ausüben, liegen außerordentlich viele Arbeiten vor. Bereits 1845 stellte *Braconnot* fest, daß Gifte eine Stimulationswirkung haben können. Zum Ausgangspunkt für die meisten Untersuchungen wurde aber bekanntlich die so auffällig das Wachstum von *Aspergillus niger* fordernde Wirkung von Zinksulfat, die erstmalig *Raulin* (1869) beobachtete. An ihn schlossen sich in zeitlicher Reihenfolge *Richards* (1897), *Ono* (1900), *Richter* (1901), *Javillier* (1908), *Bertrand* (1911 u. ff.), *Pringsheim* (1914), *Steinberg* (1918 u. ff.), *Gassner* (1926), *Niethammer* (1927 u. ff.), *Gračanin* (1928), *Bortels* (1929), *Metz* (1930), *Mac Hargue* (1931), *Porges* (1932) und viele andere an. Hier interessiert naturlich nicht im einzelnen, was fur eine Rolle das Zinksulfat im Leben des *Aspergillus* und anderer Pflanzen spielt. Aber es ist für die Auffassung von „Reiz“ und „Ernahrung“, die sich in der langen Zeit eigentlich wenig geklärt hat, wichtig zu wissen, wieviel darüber gearbeitet worden ist. Heute weiß man endlich durch *Steinberg*, *Bortels*, *Roberg* und *Sommer*, daß *Raulin*s Auffassung, Zink sei ein unentbehrliches Element, für Pilze und höhere Planzen gleichermaßen zutrifft, *Bortels* besonders hat das Verdienst, die Wirkung des Zinks als Biokatalysator durch seine Erklarungsversuche dem Verstandnis naher gebracht zu haben. Andere Metalle, wie Eisen, Mangan, Kupfer, Nickel, Kobalt, vielleicht auch manche andere, üben auch bestimmte Reize aus, die sich alle darin außern, daß der Pilz (in den meisten Fallen *Aspergillus niger*) seine Nahrungsaufnahme in bestimmter Weise verandert. Chemische Stoffe — es konnen ja außer Metallen auch andere, z. B. sogar Chloroform [*Latham* (1905)] sein — wirken nur wahrend ihrer Anwesenheit, eine Nachwirkung, wenigstens eine dem Reizstoff zuzuschreibende, tritt nicht ein. Die Erklarung all dieser „Reiz“-Erscheinungen bei Pilzen steht im starken Mißverhaltnis zu den zahlreichen Untersuchungen und ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht bündig zu geben. *R. Meyer* (1930) wendet sich scharf gegen die Aufstellung von Theorien auf Grund unzureichender Versuche und weist mit Recht darauf hin, daß Zahl und Gewicht der systematischen Fehler die Meßfehler und Streuungen, fur deren alleinige Korrektur die Fehlerrechnung da ist, bei weitem überwiegen. Dazu kommt, daß Pilze auf viele Kleinstbedingungen reagieren, die man im Versuch nicht kontrollieren kann, daher die allbekannten „Schwankungen“. Kurz, im Grunde durfte man zur Stunde gar keine Erklarungen geben für Reizerfolge. Dennoch hat bereits *Pfeffer* (1895) erortert, wie Erfolge, etwa die *Raulin*s, zu erklaren seien. Soweit katalytische Reize in Betracht kommen, wie im Falle des Zinksulfats, darf man wohl die Steigerung des Stoffwechsels und der sonstigen Lebensvorgange als Abwehrreaktionen des bedrohten Organismus auffassen [*Pfeffer*, *Gassner* (1926)]. Von wirklichen Reizen spricht *Pfeffer* als von „physiologischen Auslösungen“, und darin liegt bereits der Begriff „Katalyse“. Man kann also die Erscheinungen um den „Reiz“-Begriff vielleicht einteilen in *echte Reize*: Auslosungen durch Stoffe, die entweder nicht mit in den Stoffwechsel gerissen werden oder wenigstens nicht abgebaut werden können und somit Katalysatoren gleichkommen (für diese gelten *Bortels* Erklärungsversuche), und in *scheinbare Reize*, die

lediglich eine ernahrungsphysiologische Erscheinung darstellen, insofern bei ihnen der Reizstoff mitverarbeitet und abgebaut wird. In solchen Fallen trägt (nach *Pfeffer*) „der Anstoß einen Energiezuwachs in die Reizreaktion." Auf diese Fälle kommt es hier an bei der Erklärung des Keimverhaltens der Sporen von *Bombardia lunata* und auf diese „Induktoren" nach *Mittasch* (1935), der in seiner Übersicht über die Biokatalysatoren diese zweierlei Stoffe Katalysatoren und Induktoren nennt, zwei Namen, die sich durchaus verwenden lassen.

Ich bin auf Grund meiner Versuchsergebnisse zu folgender Arbeitshypothese gekommen: Man kann sich die Wirkung eines jeden Stoffes, der für Reiz oder Ernährung eines Pilzes irgend in Frage kommt, auf einer Geraden dargestellt denken, auf der nach der einen Seite der Reizwert, nach der anderen der Ernährungswert so aufgetragen ist, daß beide sich zu 100, also der vollen Wirkung aus beiden Komponenten, ergänzen. So ergibt sich ein Schema physiologischer Klassifizierung, das alle Stoffe, die fur Reizung, also Förderung und Schädigung, und Ernährung von Pilzen in Betracht kommen, umfaßt. Freilich wissen wir nicht von Prozent zu Prozent den Reiz- und Nährwert eines Stoffes, aber wir können ihn etwa schatzen. Die Schätzung ist nicht ganz willkürlich, sondern geschieht durch Vergleichen der Kurven. Der Reizwert eines Stoffes, der bei 0,1 % keine Keimung mehr zuläßt, ist selbstverstandlich größer als der eines anderen, der noch die Keimung von 40 % Sporen erlaubt. Die Keimung der Sporen bei 0,1 % Maleinsaure oder Weinsäure zeigt den überwiegenden Nahrgehalt dieser Sauren an usw.

Bei der Weinsaure verhalten sich Reiz- und Nahrwert etwa wie 40 : 60 %, bei der Maleinsaure wie 50 : 50 %, bei der Apfelsäure wie 25 : 75 %, bei der Essigsäure wie 60 : 40 % und bei der β-Indolylessigsäure wie 90 : 10 %. Da also bei Wein-, Malein- und Apfelsäure der Nahrwert 40 bzw. 50 bzw. 75 % betragt und der Sauregrad nicht stark hervortritt, erhielt ich bei 0,1 % Säurezusatz Keimprozente in der Nähe der Kontrolle. Die Stelle, wo die Keimungskurve die Kontrolle beim Aufsteigen schneidet [in der Kurve für Maleinsäureeinzelwerte vielleicht bei 0,06 %, in der der Serienversuche (mit viel höherer Kontrolle, siehe S. 330) bei 0,05 %, in beiden Weinsäureserienkurven bei 0,032 %] wäre demnach aufzufassen als der Gehalt an gelöster Säure, dessen absolute Reizmenge neutral wirkt (s. S. 331/332). Das Keimungsoptimum (in der Kurve für Maleinsäureeinzelwerte bei 0,033 %, Serienwerte 0,01 %, Weinsäureserien zwischen 0,02 und 0,01 %) ist zu verstehen als der Punkt, an dem der Reizwert klein genug ist, um als Stimulans zu wirken, d. h. an dem der Wirkungsgrad des fördernden Anteils den höchsten Grad erreicht hat, und an dem der Nährwert groß genug ist, um eine der Auslösung entsprechende Keimung zu gewährleisten. Ein absoluter Reiz, ein Stoff mit 100 % Reizwert, ist sinnlos bei der künst-

lichen Kultur unserer Pilze. Wenn nämlich das Substrat des Pilzes Reizstoffe enthält bei ungenügender Nahrung, so verzehrt der Pilz alles, was er erreichen kann, und dann tritt Autolyse ein. [Das starke Abfallen der Wachstumskurve eines anfänglich mit Zinksulfat gereizten *Aspergillus niger* ist von *Richter* (1901) zuerst bemerkt worden.] Nur wenn die nötige Nahrung nach Menge und Güte da ist, kann ein Reiz sinnvoll wirken. Schon *Pringsheims* Versuche mit Zinksulfat zeigen eine Förderung durch das Gift erst bei höheren Nährstoffkonzentrationen. Auch nach *Niethammer* (1927) steht der Giftwirkung nur bei guter Ernährung eine Reizwirkung gegenüber. *Pfeffer*, *Butkewitsch* und *Orlow* (1922) haben darauf hingewiesen, daß katalytische Reize — möglicherweise auch scheinbare — den Pilz veranlassen, ökonomischer zu arbeiten, d. h. seine Nahrung besser auszunutzen. Auch das ist aber eher eine allgemeine Beschleunigung der Lebensvorgänge als eine wirkliche Förderung. Denn der Pilz hat in natura nicht das Bestreben, alles, dessen er habhaft werden kann, sich unverzüglich einzuverleiben, sondern sein „ökonomisches Arbeiten" besteht vielmehr gerade darin, daß er gute Nährstoffe in bestimmten Mengen gleichsam aufspart und zu guter Zeit Nährstoffe mitverbraucht, mit denen allein er in schlechten Zeiten nicht lange auskommen könnte.

Gerade das hat *Pfeffer* an *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* nachgewiesen, denen er je einen guten Nahrstoff (d. h. nach obiger Hypothese einen Stoff mit stark überwiegendem Nahrgehalt), nämlich Dextrose (vielleicht 95% Nahrwert) oder Pepton, mit einem schlechten, wie Essigsäure, Glycerin oder Milchsäure, zusammen gab. Er untersuchte dann, ob und in welchem Maße ein Stoff den andern vor Verbrauch schützt. Dabei stellte sich vor allem heraus, daß die Essigsäure, die, weil sie die Dextrose nicht vor Verarbeitung schützt, ein schlechter Nahrstoff ist, durch Dextrose ihrerseits nicht vor Verbrauch geschützt wird. *Pfeffer* gibt ferner an, daß Essigsäure, Glycerin und Milchsäure das gemeinsam haben, daß sie alle drei eine schlechtere Nahrung für die Keimungsstadien sind als für das entwickelte Mycel. Damit dürfte in Einklang stehen die besonders starke Mycelentwicklung an den Kurvenpunkten der Essigsäure, an denen die Keimwerte über die Kontrolle hinausgekommen sind. Gerade die Essigsäure ist ziemlich schwer zu klassifizieren und zeigt, wie individuell und vorsichtig man die Erklärungen zu geben bemüht sein muß. Viele Pilze sind bekannt, die Essigsäure bilden und angreifen. Sie wird leicht assimiliert und gern aufgenommen, obwohl sie nach *Pfeffer* ein schlechter Nahrstoff ist. Ihr ziemlich hoher Reizwert, das Supplement zu 100, liegt demnach einerseits in der Wirkung ihres Säuregrades und andererseits gerade in ihrer physiologischen Geringwertigkeit.

Wir wissen heute einigermaßen genau, nicht nur daß Zwischenprodukte, sondern auch welche bei den Gärungsvorgängen gebildet werden, und kennen z. B. außer Alkohol noch andere Produkte, die zwischen Zucker und Kohlensäure stehen. Der Zucker wird verzehrt, wird aber nicht vollständig verbrannt, sondern der Pilz erfaßt nur einen

Teil seines Nährgehaltes. Die Zwischenprodukte haben also, wenigstens in der Gesamtheit gesehen, einen immer geringeren Nähr- und einen daher immer steigenden Reizwert bis hin zur Kohlensäure, bei der dann die Ausnutzung des Nährstoffes zu Ende ist [siehe dazu auch *W. Thies* (1930)]. Die Reizwerte der Zwischenprodukte liegen also um so höher, je weiter der Nährstoff abgebaut ist. Die Essigsäure wird als Zwischenprodukt demnach erst gebildet, wenn der Abbau des Nährstoffes schon ziemlich vorgeschritten ist. Somit ist auch die Wirkung der β-Indolylessigsäure als „Wuchsstoff" durchaus verständlich. Nach dem eben Dargelegten ist sie ein Erzeugnis, das erst gegen Schluß des Ernährungsvorganges von dem Pilz gebildet wird. Dennoch ist sie nicht als „Abfallprodukt" zu werten, denn nach *Pfeffer* kommen „auch die Eigenprodukte als reale Existenzen in Betracht". „Und wenn ein verarbeitbarer Körper (der also noch einen Nährgehalt hat!) zur Entstehung kommt, so ist eben damit angezeigt, daß er in statu nascendi unter den obwaltenden Verhältnissen nicht der Verarbeitung anheimfiel . . ." Vor allem aber: „Ohne zureichende Beachtung des Zusammenwirkens der Nahrung und der Produkte ist an ein Verständnis der realen Umsetzungen im Organismus nicht zu denken. Doch darf man nie vergessen, daß schon die Produktionstätigkeit an sich verschieden sein kann, daß also eine Variation in den Erzeugnissen nicht schlechthin in veränderter Konsumierung und Deckung begründet sein muß."

Die Ergebnisse meiner Versuche legen eine Vorstellung nahe, die sich an die Ansichten *Pfeffers* anschließen läßt: Der Nährstoff wird zunächst einmal verzehrt und unvollstandig verdaut. Dann wird ein Zwischenprodukt gebildet mit geringerem Nähr- und höherem Reizwert. Dieses wird wieder verzehrt und so fort, bis am Ende der Nährwert gegen 0 sinkt und der Reizwert gegen 100 steigt. Die Zugabe von Stoffen mit so hohem Reizwert ist nur dann sinnvoll, wenn, wie das in der Natur zu sein pflegt, der Pilz nun eine weitere Menge von Nährstoff in Angriff nehmen kann. In diesem Falle wird der Vorgang der Nahrungsaufnahme optimal immer weiter gehen, denn der kleinen Menge von Stoffen mit gegen 100 % Reizwert wird normalerweise die entsprechende große Menge Nährstoff gegenüberstehen. Dann ist es meines Erachtens auch kein Zufall, wenn ein Stoff wie Maleinsäure mit 50 : 50 % abgeschätztem Reiz- und Nährwert die besten Ergebnisse bezüglich Keimungsförderung gezeitigt hat, und zwar sogar noch bei einer Kontrolle von über 71 %.

Zu der vorhin bereits erwähnten Beschleunigung der Lebensvorgänge vorwiegend durch katalytische Reize ist noch nachzutragen, daß im Zuge der Reizwirkung Zwischenstufen offenbar übersprungen werden, der Oxydationsprozeß also intensiviert wird. So sagt *Bernhauer* (1932, S. 87) über den Einfluß von Wachstumsstimulatoren, „daß

ihre Gegenwart für die Säurebildung in der Regel ungünstig ist, da durch sie zuviel Zucker für den Wachstumsprozeß verbraucht wird und so für die Säurebildung verloren geht“. Andere Forscher bestätigen das. Wenn *Porges* (1932) mitteilt, daß *Aspergillus niger* in 10 %iger Zuckerlösung mit 0,01 % Zinksulfat neben höherem Trockengewicht *mehr* Citronensäure gebildet hatte, so widerspricht das dem Gesagten nicht. Denn wenn die Lebensvorgänge intensiviert und Zwischenstufen übersprungen werden, so kann gerade die noch übrigbleibende Zwischenstufe einen höheren Ertrag ergeben als gewöhnlich.

Zu besprechen bleibt noch die merkwürdige Erscheinung des in jeder Kurve auftretenden Knickes. Der Knick war mir von vornherein aufgefallen und blieb immer an der gleichen Stelle, die von einer Säure zur anderen wechselt, für jede aber charakteristisch ist. Es schien möglich, daß der Knick nur ein regelmäßig wiederkehrender Fehler sei. Darum suchte ich durch eine große Zahl von Wiederholungsversuchen am charakteristischen Beispiel der β-Indolylessigsäure die Entscheidung herbeizuführen mit dem Ergebnis, daß der Knick nicht verschwunden ist, obwohl 19000 bis 24000 Sporen an jedem zweifelhaften Kurvenpunkt und 148045 insgesamt, davon 23800 zur Kontrolle gezählte, in Betracht gezogen worden sind (Abb. 7). Zwar sinkt der Wert von 0,02 % nicht mehr unter den von 0,03 % Säure. Sein Steigen um 1,62 % ist aber so gering, daß sich für die Gesamtkurve doch noch ein offensichtlicher Knick ergibt. Wenn der Knick bei der β-Indolylessigsäure wirklich real ist, und wenn die bei den drei anderen geprüften Säuren stets auftretenden Knicke gleichfalls als gesichert angesehen werden können, muß nach einer Erklärung gesucht werden.

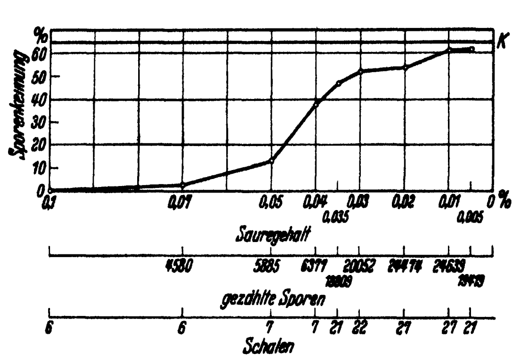


Abb. 7. Kurve des Gesamtdurchschnitts der in Versuchen mit β-Indolylessigsäure erhaltenen Werte.

Das Verständnis erleichtert eine Aufzeichnung der Kurven nach der Molarität der Säuren statt nach Gewichtsprozenten (Abb. 8). Für eine Erklärung der Knicke wie auch des Verlaufs aller Kurven kommt wohl in erster Linie die Diffusion in ihrer Beziehung zur Permeabilität der Sporenmembran in Betracht. Wie die Säuren wirken, die in die Sporen diffundieren, ist mit Hilfe meiner Arbeitshypothese über den Nähr- und Reizgehalt jedes Stoffes verständlich. Und der Knick kann durch folgende Überlegung am Beispiel der β-Indolylessig-

säure vielleicht dem Verständnis erschlossen werden: Von 0,05 bis 0,03 % (entsprechend einer Molarität von 0,001 75 bis 0,002 84) Zusatz — diese Stufen kommen ja hauptsächlich in Betracht — steigen die Keimprozente an oder, besser, wird die Keimung immer weniger gehemmt. Die Konzentration ist hier also groß genug, daß die Säure jeweils die dicke Sporenmembran durchdringen kann. Sie kommt von allen Seiten gleichmäßig an das Plasma heran und schädigt es physiologisch und damit die Keimung. Ein etwaiges Keimschlauchwachstum der gekeimten Sporen ist durch den zu hohen p_H-Wert ausgeschlossen. Je geringer die Menge zugesetzter Säure wird, desto kleiner wird die Schädigung, desto höher steigen die Keimprozente. Ein Säuregehalt von

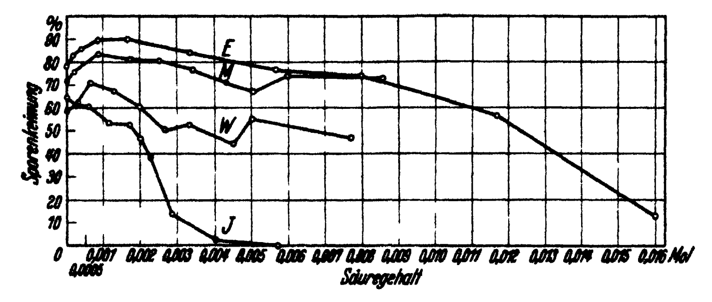


Abb. 8. Die Gesamtdurchschnittskurve der β-Indolylessigsaure (J), der Durchschnitt der beiden Weinsäurekurven in Abb. 5 (W), die Maleinsäureserienkurve in Abb. 4 (M) und die Essigsäurekurve in Abb. 1 (E), alle mit Angabe des Säuregehaltes in Mol statt Gewichtsprozent. Der bei 0 Mol eingezeichnete Wert bedeutet den jeweils dazugehörigen Kontrollwert.

0,02 % (entsprechend einer Molarität von 0,001 16) ist nicht mehr in der Lage, die dicke Sporenwand in der immer gleichen, der Spore zur Keimung zur Verfügung stehenden Zeit zu permeieren. Die Sporen, die übrigens bei *Bombardia lunata* fast immer nur einen Keimporus haben, erreichen während dieser Zeit den optimalen Quellungsgrad ihrer Membran, der Voraussetzung für die Keimung ist. In vollturgeszentem Zustand, wenn die Sporen unmittelbar vor der Keimung stehen, dehnt und wölbt sich das zarte Verschlußhäutchen der Keimpore und bietet der Säure die Möglichkeit, an dieser dünnen Stelle in die Sporen einzudringen. Hier schädigt die Säure das Plasma an der empfindlichsten Stelle. Daß die Keimprozente, wenn die Säure durch den Porus eindringt, niedriger liegen, als wenn sie durch die ganze Membran permeiert, kann erklärt werden, indem von der am Keimporus eindringenden Säure nur der Reizgehalt wirkt, der das Plasma lokal sehr schädigt und die Sporen am Auskeimen hindert. Vielleicht tritt dort eine Entquellung ein. Kommt die Säure dagegen von allen Seiten, so kann sofort ihr Nährgehalt ausgenutzt werden. Insofern erhöht sie die Lebenskraft der

Spore, und der Reizgehalt der Säure wirkt nicht als Schädigung, sondern als Stimulans.

Das Wachstum ist bei 0,02 % (0,001 16 Molarität) β-Indolylessigsäure nur wenig gehemmt, nur noch verlangsamt. Daher haben nicht geschädigte, gekeimte Sporen hier ein Mycel von 8 bis 12 Sporenlängen (Abb. 2, S. 333). Bei den weiteren geringeren Säuremengen nimmt die Wachstumsverlangsamung stetig ab: Das p_H nähert sich 7. Bei 0,01 % (0,000 6 Molarität) Säurezusatz ist die Schädigung durch den Keimporus noch geringer, und die absoluten Reizmengen nähern sich dem physiologischen Optimum, das (außer bei der β-Indolylessigsäure) als Maximum der Kurve auftritt. Werden die Reizmengen noch kleiner, so hört eben der zusätzliche Ernährungsreiz — und bei der β-Indolylessigsäure der Schädigungsreiz — auf, und die Kurve läuft gerade auf die Kontrolle zu. Das ist nicht immer gut zu sehen, weil hier bei den gegen 0 strebenden Zusatzwerten die „systematischen" Fehler *Meyer*s wieder fühlbarer werden und ein genaues Ergebnis sehr erschweren.

Die Abb. 3, S. 334 zeigt das Keimbild bei 0,03 % β-Indolylessigsäure etwa 260fach vergrößert, Abb. 4, S. 335 zeigt die Keimung bei 0,02 %. Die Schalen sind der gleichen Serie entnommen. Die Sporen waren mit Formol abgetötet. Zur Aufnahme wurden Stellen gewählt mit möglichst viel gekeimten Sporen.

Von den Kurven der Nährsäuren ist die der Maleinsäure nicht schwer zu verstehen. Eine richtige Schädigung gibt es in den untersuchten Grenzen überhaupt nicht. Der eine Knick ist wohl ebenso zu erklären wie bei der β-Indolylessigsäure. Hier hat man sich wiederum vorzustellen, daß durch die Keimpore eindringende Säure die Keimung verhindern kann, durch die ganze Membran diffundierende dagegen weniger.

Die seltsame Wiederholung des Knickes bei der Weinsäure ist indessen schwerer verständlich. Für den Einzelfall ist grundsätzlich die gleiche Erklärung anzunehmen. Ein Doppelknick tritt aber gerade nur bei der racemischen Wein- und Apfelsäure in ganz ähnlicher Form auf. Man könnte daher vermuten, daß die Sporen eine enzymatische Spaltung vornehmen, wobei zuerst die eine, dann die andere Form der Säure gleichartig wirkt.

Besonders die Gesamtkurve für die β-Indolylessigsäure zeigt die Form einer Schädigungskurve. Insofern alle vier Säuren in (verschieden) starker Lösung die Keimung hemmen, kann man auch für alle Fälle *S*-Kurven erwarten, die nur durch die Förderung in kleinen Mengen modifiziert werden. Besonders schön zeigt das die Essigsäurekurve. Auf Grund meiner Versuche und meiner Arbeitshypothese kann ich also als mögliche Kurven annehmen für reine Reizstoffe eine eindeutige *S*-Kurve und für Stoffe mit Förderungskraft Kurven, die früher oder

später mehr oder weniger *über* die Kontrolle hinauskommen, um sich dann den Kontrollwerten wieder anzuschmiegen, vorausgesetzt, daß keine oligodynamischen Wirkungen auftreten.

Zusammenfassung.

1. Die β-Indolylessigsäure hat unter guten Keimungsbedingungen keine stimulierende Wirkung auf die Keimung der Askosporen von *Bombardia lunata.* Die Gesamtkurve der Keimung bietet vielmehr das Bild einer Schädigungskurve. Die Kurve kann indessen bei höherer Lage der Kontrollen höher, aber trotzdem stets unter der Kontrolle liegen, bei tieferen Kontrollen kann dagegen eine Förderung durch die Säure beobachtet werden, d. h. die Kurve übersteigt in dem bestimmten Bereich die Kontrollkurve.

2. Mit Malein-, Wein- und Essigsäure wurden gleichfalls Versuche durchgeführt. Ihre Ergebnisse sind auch in Kurven festgehalten, die grundsätzlich den β-Indolylessigsäurekurven gleichen.

3. Die aufgefundenen Beziehungen zwischen den Mengen gekeimter Sporen in Versuch und Kontrolle bei verschieden hohen Säurezusätzen habe ich mit Hilfe einer Arbeitshypothese zu verstehen und zu erklären versucht. Es wird angenommen, daß in jedem Stoff, der einem Pilz zur Verfügung steht, sich Nährwert und Reizwert zu 100% ergänzen. Diese Auffassung ist möglich auf Grund von *Pfeffer*s Anschauungen über die Ernährung von Pilzen.

4. Danach kann man in echte Reize und in scheinbare Reize einteilen. Jene werden durch Katalysatoren, die in den von ihnen ausgelösten Stoffwechselvorgang nicht mit hineingerissen werden, eingeleitet, diese durch Induktoren, die anteilgemäß mitverbraucht werden.

5. Für die Wahl und Anwendung von die Sporenkeimung stimulierenden Stoffen ist also einerseits das günstigste Verhältnis von Reiz- zu Nährwert in dem betreffenden Stoff und andererseits das günstigste Verhältnis des Reizwertes des Stoffes zu den sonstigen, den Pilz oder die Spore umgebenden Substanzen maßgebend, wie *Pringsheim* und *Niethammer* zeigten.

6. Bei den Kurven aller Säuren kann an einem charakteristischen Punkt ein Knick beobachtet werden. Die Ursache dieser Erscheinung liegt offenbar darin, daß von einer bestimmten Säurekonzentration abwärts die Säure in der zur Keimung zur Verfügung stehenden Zeit nicht mehr die ganze Sporenmembran durchdringen kann. Unmittelbar nach Unterschreitung dieses Schwellenwertes kann die Säure aber noch die Verschlußhaut der Keimpore durchdringen, dort das Plasma unmittelbar schädigen und somit die Spore am Auskeimen hindern. Noch geringere Säuremengen können die Keimprozente erhöhen, wenn der

Wirkung des Reizgehaltes ein etwa gleicher Nährgehalt entspricht wie bei Malein-, Wein- und Essigsäure.

Die Erscheinung zweier Knicke bei der Wein- und Apfelsäure könnte auf eine enzymatische Spaltung dieser racemischen Säuren — nur die racemischen Formen wurden angewandt — durch die Sporen zurückgeführt werden. Man hätte sich dann vorzustellen, daß erst von einer bestimmten Säuremenge an abwärts (nach dem ersten Knick) die optisch aktiven Formen auftreten und einen neuen Knick nach der obigen Erklärung verursachen.

7. Auf Grund der erhaltenen Kurven und obiger Arbeitshypothese kann man für alle sonstigen zu untersuchenden Stoffe zwei Typen von Kurven erwarten, reine Schädigungskurven und Kurven, die irgendwann die Kontrolle überschreiten bis zu einem Maximum, um sich ihr dann wieder zu nähern.

Modifiziert werden können alle Kurven durch Permeabilitätsunterschiede an verschiedenen Stellen der Membran (z. B. Keimporen).

Die Versuche zu vorliegender Arbeit wurden in der Zeit von April 1935 bis Oktober 1936 im Botanischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a. M. ausgeführt. Herrn Prof. Dr. *Fr. Laibach* möchte ich an dieser Stelle für seine rege Anteilnahme und stete Förderung herzlich danken. Ferner danke ich Herrn Dr. *H. Zickler* für manche Anregung und Gefälligkeit sowie Herrn *K. Reis* für die Anfertigung der Mikroaufnahmen bestens.

Literatur.

Almoslechner, E., Planta **22**, 515, 1934. — *Berg, H. vom*, ebenda **9**, 105, 1930. — *Bernhauer, K.*, Die oxydativen Garungen. Berlin, Jul. Springer, 1932. — *Bertrand, G.* u. *M. Javillier*, C. r. Paris **152**, 900, 1911 u. folgende. — *Bortels, H.*, Angew. Bot. **11**, 285, 1929. — *Brown, W.*, Ann. of Botany **36**, 257, 1922. — *Burgert, J. A.*, Phytopathology **24**, 384, 1934. — *Buromsky, I.*, Centralbl. f. Bakt. II, **36**, 54, 1913. — *Butkewitsch, Wl.*, u. *W. G. Orlow*, Biochem. Zeitschr. **182**, 556, 1922. — *Coupin, H.*, C. r. Paris **157**, 1474, 1913. — *Cruess, W. V.*, *P. H. Richert* u. *I. H. Irish*, Hilgardia **6**, II, 295, 1931. — *Doran, W. L.*, Bull. Torrey Bot. Club **49**, 313, 1922. — *Duggar, B. M.*, Botanical Gazette **31**, 38, 1901. — *Edgerton, C. W.*, Louisiana Agr. Exp. Sta. Bull. **119**, 1, 1910. — *Fellers, C. R.*, J. of Ind. and Engin. Chem. 8, 1128, 1916. — *Fischer, E.*, u. *E. Gäumann*, Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Jena, Fischer, 1929. — *Gassner, G.*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **44**, 341, 1926. — *Giřzitska, Z.*, Bull. Jard. Bot. Kiew **16**, 33, 1933 (russisch mit englischer Zusammenfassung). — *Gračanin, M.*, Biochem. Zeitschr. **194**, 215, 1928. — *Hassebrauk, K.*, Phytopatholog. Zeitschr. **5**, 173, 1932. — *Hemmi, T.*, Proc. Fifth Pacific Sci. Congr. 3187, 1934. — *Hoffmann, H.*, Jahrb. f. wiss. Bot. **2**, 267, 1860. — *Javillier, M.*, La présence et le rôle du zinc chez les plantes. Thèse. Paris, 1908. — *Itano, A.*, Proc. Imperial Acad. Japan **9**, 398, 1933. — *Derselbe*,

Ber. d. Ohara-Instituts in Kurashiki 8, 59, 1933/35. — *Itano, A.*, u. *Y. Tsuji*, ebenda 8, 575, 1933/35. — *Kirmsse, K.*, Untersuchungen über die Eignung des *Zade*schen Formaldehyd-Auslaugungs-Beizverfahrens zur Bekämpfung des Gerstenhartbrandes (*Ustilago hordei*). Dissertationsauszug (Maschinenschrift). Leipzig 1924. — *Latham, M. E.*, Bull. Torrey Club 32, 337, 1905. — *Lepierre, C.*, C. r. Paris 156, 258, 1913. — *Lopriore, G.*, Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. 28, 531, 1895. — *Mac Hargue, J. S.*, u. *R. K. Calfee*, Bot. Gaz. 91, 183, 1931. — *Metz, O.*, diese Zeitschr. 1, 197, 1930. — *Meyer-Nienbüttel, R.*, ebenda 1, 277, 1930. — *Mittasch, A.*, Über katalytische Verursachung im biologischen Geschehen. Berlin, Jul. Springer, 1935. — *Nielsen, N.*, u. *V. Hartelius*, C. r. du Laboratoire de Carlsberg 19, H. 15, S. 1, 1933. — *Niethammer, A.*, Biochem. Zeitschr. 184, 370, 1927. — *Dieselbe*, Cohns Beiträge zur Biol. d. Pflanzen 16, 267, 1928. — *Dieselbe*, Biologia generalis 4, 259, Wien 1928. — *Ono, N.*, J. coll. sci. Imp. Univ. of Tokyo 13, P. 1, 141, 1900. — *Pfeffer, W.*, Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. 28, 238, 1895. — *Porges, N.*, Bot. Gaz. 94, 197, 1932. — *Porter, C. L.*, Proc. Indiana Acad. Sci. 41, 149, 1932. — *Pringsheim, E. G.*, Zeitschr. f. Bot. 6, 577, 1914. — *Derselbe*, Algenkultur (S. 377), Pilzkultur (S. 407) in: Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. 11, Teil 2, 1. H., 1924. — *Raulin*, Ann. d. sc. nat. Bot., Ser. V, Tome 11, 91, 1869. — *Reese, H.*, Der Einfluß der gebrauchten Nährlosung, des Zinks und des Mangans auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Dissertation Kiel 1912. — *Richards, H. M.*, Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. 30, 665, 1897. — *Richter, A.*, Centralbl. f. Bakt. II, 7, 417, 1901. — *Rippel, K.*, diese Zeitschr. 4, 530, 1933. — *Schmucker, Th.*, Planta 23, 264, 1935. — *Steinberg, R. A.*, Mem. Torrey Club 17, 287, 1918, und weitere Arbeiten. — *Thies, W.*, Centralbl. f. Bakt. II, 82, 321, 1930. — *Uber, F. M.*, u. *D. R. Goddard*, J. Gen. Physiol. 17, 577, 1934. — *Watermann, H. J.*, Proc. Akad. Wetensch. Amsterdam 1912, S. 579. — *Webb, R. W.*, Ann. Miss. Bot. Gard. 8, 283, 1921. — *Wilcoxon, F.*, u. *S. E. A. Mac Callan*, Phytopathology 24, 20, 1934. — *Wüthrich, E.*, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 2, 16, 1892. — *Zickler, H.*, Planta 22, 573, 1934.

(Aus dem Institut für Biochemische Technologie an der Technischen Hochschule in Wien.)

Über den Sauerstoffverbrauch und das Redoxpotential der Essigsäurebakterien.

Von

Alexander Janke.

(Eingegangen am 6. Juli 1937.)

Versuchsergebnisse mit der Warburg-Apparatur.

Kluyver und *Hoogerheide*[1] hatten — geleitet von dem Bestreben, die Messung des Redoxpotentials von Hefesuspensionen in Pufferlösungen in dem gleichen Gefäß vorzunehmen, in dem auch die Bestimmung des Stoffwechsels erfolgt — in dem Manometergefäß des *Warburg*schen Apparates eine Edelmetallelektrode angebracht und auch durch einen Kapillaragarheber für eine Elektrolytverbindung gesorgt. Diese Einrichtung benutzte nun auch *Cozic*[2] zur vergleichenden Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs und des Redoxpotentials von Suspensionen verschiedener Essigsäurebakterien und zwar von *Bact. (Acetobacter) rancens*, *pasteurianum*, *peroxydans*, *xylinum*, *aceti*, *suboxydans* und *melanogenum*.

Die in einem Acetatpuffer ($p_H = 5,5$) unter Zusatz von 1 % Äthylalkohol mit je 10 mg Bakterientrockensubstanz auf 100 ccm der Lösung ausgeführten Versuche ergaben ganz bedeutende Unterschiede in der Atmungsintensitat oder – besser ausgedrückt — im Sauerstoffverbrauch; so betrug dieser innerhalb 3 bis 4 Stunden je mg Bakterientrockensubstanz bei *B. peroxydans* 1200 cmm O_2, bei *B. suboxydans* hingegen bloß 250; der der übrigen Bakterien lag zwischen diesen beiden Grenzwerten. Die Redoxpotentiale hingegen zeigten eine ziemliche Übereinstimmung, indem sie sich um 330 bis 350 mV, entsprechend einem rH_2 von 22 bis 23 bewegten.

Ferner ergab sich die Merkwürdigkeit, daß bei Steigerung der Bakterienmenge sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch das Redoxpotential stark zurückgingen.

Cozic äußerte die Vermutung, daß für die verminderte Atmungsintensitat die unzureichende Sauerstoffversorgung der Zellen verantwortlich sei, da die Bakterien den gelösten Sauerstoff rascher verbrauchen, als bei der zulässigen Schüttelgeschwindigkeit die neuerliche Sättigung der Versuchsflüssigkeit mit diesem Gas möglich ist. Die Ursache der

[1] *A. J. Kluyver* u. *J. C. Hoogerheide*, Biochem. Zeitschr. **272**, 197—214, 1934. — [2] *M. Cozic*, Rev. gen. de botan. **48**, 141—155, 1936.

Potentialabnahme mit zunehmender Dichtigkeit der Suspension wurde in der teilweisen Umschaltung des aeroben auf den Gärungsstoffwechsel vermutet, zumal *Neuberg* und *Simon*[1] das Auftreten einer alkoholischen Gärung bei anaerob gehaltenen Essigsäurebakterien beobachtet hatten. *Cozic* konnte jedoch mit den von ihr verwendeten Bakterien bei Luftabschluß keine CO_2-Bildung feststellen.

Wie Verfasser bereits vor mehr als zwei Jahren vermutet und mit *Kropacsy*[2] auch experimentell nachgewiesen hat, treten bei der Alkoholsäuerung mittels Suspensionen von Essigsäurebakterien wechselnde Mengen von Acetaldehyd auf, die mitunter bis zu 50 % des Umsatzes betragen können. Es ist daher unstatthaft, bei der Essiggärung aus den Vorgängen im Gasraum — also aus dem Sauerstoffverbrauch — allein einen Schluß auf den Reaktionsverlauf in der flüssigen Phase zu ziehen, wie dies bei der manometrischen Methode nach *Barcroft-Warburg* der Fall ist.

Aldehydanhäufung und Änderung im Sauerstoffverbrauch bzw. im Elektrodenpotential.

Die Essigsäuregärung verläuft bekanntlich in zwei Stufen, wobei die Optimalwerte für die Wasserstoffionenkonzentration bei dem wirksamen Enzymsystem in beiden Stufen etwas voneinander abweichen. So wurde seinerzeit[2] bei Verwendung frischer Suspensionen von *Bact. ascendens* das p_H-Optimum für die Alkoholoxydation zu 5,57 bis 6,0, jenes für die Aldehyddehydrierung jedoch zu 5,9 bis 6,7 ermittelt; daraus erklärt sich auch die von uns festgestellte Tatsache, daß mit fortschreitender Säuerung infolge der Verschiebung des p_H ins saure Gebiet, die sich erfahrungsgemäß auch durch Pufferung nicht ganz vermeiden läßt, die Alkoholdehydrierung und mit dieser auch die Aldehydanhäufung begünstigt wird. Deren Förderung ergab sich ferner auch bei prozentualer Zunahme der vermehrungsunfähigen Zellen in der verwendeten Bakteriensuspension.

Da nun die oben besprochenen Versuche von *Cozic* bei einem p_H von 5,5 ausgeführt wurden, mußte eine ausgesprochene Bevorzugung der Alkoholoxydation gegenüber der Aldehyddehydrierung und daher eine erhebliche Anhäufung an Acetaldehyd eintreten. Die Essigsäurebakterien, bei denen sich diese Erscheinung besonders stark zeigt, werden eine geringere Sauerstoffzehrung aufweisen als jene Arten, die hierzu weniger Neigung besitzen. Aber auch das Absinken des Redoxpotentials mit steigender Zellenzahl läßt sich durch Aldehydanhäufung erklären. Je stärker nämlich die Dichte der Bakteriensuspension ist,

[1] *C. Neuberg* u. *E. Simon*, Biochem. Zeitschr. **179**, 443, 1926. — [2] *A. Janke* u. *St. Kropacsy*, Biochem. Zeitschr. **278**, 37—59, 1935.

um so rascher wird die Dehydrierung des Alkohols einsetzen und — da infolge des für die Alkoholoxydation günstigeren p_H-Wertes von 5,5 diese der Aldehyddehydrierung vorauseilt — die Konzentration an Acetaldehyd rasch zunehmen. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Aldehydanhäufung ein Maßstab für die Verminderung des Sauerstoffverbrauchs und die Ursache der Herabdrückung des Elektrodenpotentials ist. Dies wird dann der Fall sein, wenn die Dehydrierung des Acetaldehyds durch Essigsäurebakterien ein höheres Elektrodenpotential ergibt als die Oxydation des Äthylalkohols durch diese Mikroben, wobei die Frage, was das angezeigte Elektrodenpotential überhaupt vorstellt, zunächst unerörtert bleiben soll.

Um diesen Sachverhalt zu prüfen, kam der nachstehend beschriebene Versuch zur Ausführung. Massenkulturen von *Bact. ascendens* auf Bieragar[1] wurden von diesem mit sterilem Wasser abgeschwemmt, mehrmals sorgfältig gewaschen und durch mehrtägiges Stehen im Eisschrank gealtert. So ergab sich eine Bakteriensuspension, die im ccm 2,34 mg Bakterien-Trockensubstanz aufwies, entsprechend einer Gesamtzahl von 5,2 . 10^9 Zellen, die nach der Hefemischmethode[2] ermittelt wurde.

Die Feststellung des Elektrodenpotentials erfolgte mittels der nachfolgend beschriebenen Arbeitsweise. In sechs Bechergläsern (I bis VI) aus Jenaer Geräteglas von 50 ccm Inhalt wurden je 10 ccm eines Acetatpuffers vom $p_H = 5{,}49$ eingefüllt. Der als Verschluß dienende Gummistöpsel wies fünf Bohrungen auf, und zwar für zwei blanke Platinelektroden von 1 qcm Fläche, für einen Agarheber zur Verbindung mit einer gesättigten Kalomelelektrode und für Zu- und Ableitung der Luft; wenn keine Lüftung stattfand, erfolgte die Abschließung der fraglichen Öffnungen durch Glasstöpsel.

Das Versuchsgefäß I erhielt zu den 10 ccm des Acetatpuffers einen Zusatz von 30,7 mg absolut. Alkohol, das Gefäß II einen solchen von 29,3 mg Acetaldehyd, so daß sich in beiden Fällen eine m/15-Lösung des jeweiligen Substrates vorfand. Die Beimpfung erfolgte mit je 0,4 ccm der Bakteriensuspension, entsprechend 1 mg Bakterientrockensubstanz. Während diese beiden ersten Versuche der Beantwortung der Frage dienen sollten, ob das Elektrodenpotential der Bakteriensuspension in einer Acetaldehydlösung einen höheren Wert annimmt als in einer äquimolekularen Alkohollösung, waren die weiteren Versuche dem Studium des Einflusses der Bakterienmenge gewidmet, und zwar einmal in ungelüfteten Ansätzen (Gefäße III und IV) und ein andermal in gelüfteten (Gefäße V und VI). Die Gefäße III und V erhielten die gleiche Bakterienbeimpfung wie I und II, die Ansätze IV und VI hingegen die zehnfache Menge, also entsprechend 10 mg Bakterientrockensubstanz in 10 ccm. Um die hierbei schon ins Gewicht fallende Verdünnung durch die Bakteriensuspension auszuschalten, wurde diese in der Elektrozentrifuge bei 3500 Touren ausgeschleudert

[1] Näheres über die Züchtung bei *A. Janke* u. *St. Kropacsy*, l. c. — [2] Vgl. *A. Janke* u. *H. Zikes*, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden u. Leipzig 1928.

und der Bodensatz mittels der Pufferlösung in das Versuchsgefäß gespült. Nach Einsetzen des Gummistopfens betrug das Verhältnis des Luftraumes zum Flüssigkeitsvolumen rund 5, wies also den gleichen Wert auf wie bei den Versuchen von *Cozic* mit der *Warburg*-Apparatur. Sämtliche Gefäße wurden während der Versuchsdauer mittels eines Elektromotors geschüttelt. Die Messung des Elektrodenpotentials erfolgte mit dem Potentiometer von Dr. *Thrun* bei Vorschaltung eines Widerstandes von rund 50000 Ohm.

Tabelle I. Elektrodenpotentiale von *Bact. ascendens* in 10 ccm Acetatpuffer ($p_H = 5,49$).

Gefäß Nr	I	II	III	IV	V	VI
Substratkonzentration	m/15 Alkohol	m/15 Acetaldehyd	m/15 Alkohol			
Bakterientrockensubstanz	1 mg	1 mg	1 mg	10 mg	1 mg	10 mg
Lüftung	ohne	ohne	ohne	ohne	mit	mit
	Potential in Millivolt auf die Normal-Wasserstoffelektrode bezogen					
Nach 10 Min.	333	438	336	320	398	—
„ 60 „	324	438	327	285	354	345
„ 100 „	347	418	380	321	358	340
„ 140 „	347	408	386	337	358	325
„ 200 „	344	385	381	331	360	354
„ 260 „	338	384	—	—	361	343

Wie aus Tabelle I hervorgeht, ergab der Ansatz II mit m/15 Acetaldehyd ein um rund 100 mV höheres Elektrodenpotential als der Ansatz I mit m/15 Alkohol. Erst in dem Maße, als die Acetaldehydkonzentration infolge Dehydrierung abnahm, senkte sich das Potential.

Die Ansätze III und IV ergaben in Übereinstimmung mit *Cozic* für die höhere Bakteriendichte das niedrigere Potential. Nun wurde nach vierstündigem Versuch in beiden Proben eine Bestimmung des zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Acetaldehyds vorgenommen, wobei für III 4,4 mg, für IV hingegen 8,9 mg erhalten wurden, d. h. bei der höheren Bakterieneinsaat hatte sich nahezu ein Drittel des verwendeten Alkohols in Form von Acetaldehyd angehäuft, was ja nach den obigen Ausführungen zu erwarten war. Infolge des stärkeren Überwiegens der Alkoholoxydation gegenüber der Aldehyddehydrierung in IV im Vergleich zu III mußte diese Probe ein höheres Potential als IV aufweisen.

Die Lüftungsversuche V und VI zeigten anfänglich ein höheres Potential als die entsprechenden Versuche ohne Lüftung, doch glichen sich die Unterschiede späterhin ziemlich aus. Um zu sehen, ob nicht vielleicht die Luftzufuhr ungenügend sei, wurde im Ansatz VI in der 6. Versuchsstunde die Lüftung stark gesteigert; es ergab sich jedoch keine Erhöhung des Potentials, vielmehr eine Senkung um 10 mV, so

daß demnach offenbar auch in allen anderen Ansätzen kein Luftmangel herrschte.

Daß der Acetaldehyd nicht *unmittelbar* auf das vermutliche Redoxsystem der Bakterien, das sogenannte „Bioindikatorsystem" nach *Kluyver*, wirkt, geht aus einem Versuch hervor, bei dem zum säuernden *Bact. ascendens* in Acetatpufferlösung Acetaldehyd hinzugefügt wurde, ohne daß eine Änderung des Elektrodenpotentials erfolgte.

Zusammenfassung.

Die bei der Essigsäuregärung zu beobachtenden Unstimmigkeiten betreffend Sauerstoffverbrauch und Elektrodenpotential lassen sich durch das Auftreten des Acetaldehyds als Zwischenprodukt zwanglos erklären, wofur bezüglich des Potentials der experimentelle Nachweis geführt wird.

--- --- ---

Sammelberichte.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Uppsala.)

Über den Gärungsmechanismus in der lebenden Hefezelle[1].

Von

Ragnar Nilsson.

Mit 14 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Juli 1937.)

Die relativ einfache Bruttoformel der alkoholischen Gärung:

$$C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

läßt kaum vermuten, daß es eine besonders schwierige Aufgabe sein müsse, das chemische Reaktionsspiel bei dieser Art von Kohlenhydratabbau in seinen Einzelheiten zu erforschen. Während der Entwicklung, die die Gärungschemie in diesem Jahrhundert erfahren hat, hat es sich indessen gezeigt, daß die scheinbar recht einfache Reaktion eine Menge Geheimnisse verbirgt, die äußerst schwer zu enträtseln sind.

Man fragt sich, was die Veranlassung war, so ungeheuer viel Arbeit der Erforschung gerade dieser Reaktion zu opfern, wie man es tatsächlich getan hat, und warum man immer noch, obwohl das Problem nach allen diesen Bemühungen eigentlich nur noch komplizierter erscheint, als es anfänglich war, allen Grund hat, die Arbeit fortzusetzen.

Ich glaube, daß wir die Antwort auf diese Frage in folgenden beiden Umständen zu suchen haben. Einmal ist die Hefe einer der am leichtesten zugänglichen und aus vielen Gesichtspunkten sympathischsten Stoffe für biochemische Untersuchungen. Gerade diesem Umstand haben wir es wohl zu verdanken, daß sich die Biochemie schon früh dem Kohlenhydratabbau in der Hefe in großem Umfang widmete. Dann stieß man aber beim Studium des Gärungsmechanismus noch auf verschiedene Teilreaktionen, die eine Bedeutung nicht nur für die alkoholische Gärung, sondern auch für eine große Anzahl vitaler Erscheinungen im Tier- und Pflanzenreich haben. Es handelt sich hier um Reaktionen, die vielleicht die meisten Tier- und Pflanzenzellen — in gewissem Umfang — verwenden, um einen sehr wichtigen Teil ihrer biochemischen Funktionen ausüben zu können. Dies gibt selbstverständlich den in der Gärungschemie errungenen Ergebnissen einen

[1] Vortrag, gehalten im Verein für Mikrobiologie zu Stockholm am 11. Dezember 1936 und in der Chemischen Gesellschaft zu Uppsala am 13. Mai 1937.

verstärkten Wert und macht, daß die Erforschung des Reaktionsmechanismus der alkoholischen Gärung heute noch als eine der anregendsten Aufgaben der Biochemie erscheint.

Das Ziel aller Untersuchungen über die alkoholische Gärung muß natürlich das sein, zu erforschen, wie die lebende Hefezelle sich verhält, um diesen typisch biochemischen Vorgang durchzuführen, und wie dieser Vorgang normalerweise in allen Einzelheiten in der lebenden Zelle verläuft. Alle Versuche, die über die normale, ungestörte Gärung mit lebender Hefe ausgeführt wurden, haben indessen nur sehr bescheidene Beiträge zum Verständnis des Reaktionsmechanismus bei der Gärung gegeben. Eigentlich ist ja dies recht verständlich. Wenn wir von einigen in quantitativer Hinsicht weniger wichtigen Nebenreaktionen absehen, wie von dem Zuckerverbrauch, der durch die Atmung bzw. den Aufbau von Zellsubstanz bedingt ist, so wird ja bei der normalen Gärung der zugeführte Zucker vollständig zu Alkohol und Kohlensäure abgebaut — in jedem Zeitpunkt während des Gärungsverlaufs entspricht der verschwundene Zucker dem gleichzeitig gebildeten Alkohol und der entstandenen Kohlensäuremenge. Damit dies möglich ist, muß das Fermentsystem der lebenden, intakten Hefezelle offenbar derart organisiert sein, daß die Intermediärprodukte, die beim Abbau entstehen, unmittelbar von anderen Teilenzymen der Hefe angegriffen und zu den Schlußprodukten weiter abgebaut werden — und zwar mit einer Geschwindigkeit, die diejenige nicht unterschreiten darf, mit der sie gebildet werden. Auf diese Weise kommt es also zu keiner Anhäufung von Intermediärprodukten im Verlauf der Gärung. Sie entstehen nur in dem Maße, wie sie von der Hefe zu den Schlußprodukten weiter umgewandelt werden können.

Um einen Einblick in das Reaktionsspiel der Gärung zu bekommen, ist es offenbar notwendig, daß wir auf die eine oder andere Weise den normalen Gärungsverlauf stören, damit die intermediären Teilreaktionen in Erscheinung treten können. Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Methoden, die wir hierbei anwenden können. Einmal können wir zur Gärungsmischung Stoffe zusetzen, die mit den postulierten Intermediärprodukten reagieren und sie dadurch dem weiteren Abbau entziehen. Sodann können wir die Organisation des Fermentsystems der intakten Hefezelle stören, derart, daß die Wirkung eines oder mehrerer Teilenzyme im Vergleich mit der der anderen Enzyme geschwächt oder ganz vernichtet wird. Es kann dies durch spezifische Vergiftungen erreicht werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß wir nicht mit lebenden, intakten Hefezellen arbeiten, sondern mit aus der Hefe dargestellten, mehr oder weniger desorganisierten Zymasepräparaten. Das Arbeiten mit solchen Präparaten bietet außerdem den großen Vorteil, daß wir hier — verglichen mit der lebenden Hefezelle — das vergärende Prinzip sozusagen freigelegt und für den chemischen An-

griff zugänglich gemacht haben. Haben wir es mit intakten Hefezellen zu tun, so müssen wir in Betracht ziehen, daß die Stoffe, die wir der Reaktionsmischung zusetzen, zunächst in das Zellinnere eindringen müssen, um die Möglichkeit zu haben, auf den Gärungsmechanismus einen direkten Einfluß auszuüben. Von grundlegender Bedeutung für die Einwirkung eines Stoffes auf die Gärung mit frischer Hefe ist daher unter anderem seine Fähigkeit, die Membran der Hefezelle zu durchdringen bzw. auf die Permeabilitätsverhältnisse der Membran einzuwirken.

Es bedeutete deswegen einen für die Gärungschemie ungeheuer befruchtenden Abschnitt, als es *Buchner* gelang, das zuckervergärende Prinzip der Hefe aus der lebenden Hefezelle abzuscheiden und mit seinen Preßsäften dieses Prinzip zu einem Katalysatorkomplex zu machen, der mit der gewöhnlichen chemischen Untersuchungstechnik durchaus angreifbar ist. Erst durch Untersuchungen an solchen Preßsäften oder an den später erfundenen, ebenfalls zellfreien Mazerationssäften sowie an Trockenhefepräparaten ist es geglückt, einen Einblick in die sehr komplizierte Reaktionskette zu bekommen, die sich in der Hefe abspielt, wenn sie einen Zucker zu Alkohol und Kohlensäure vergärt. Die Ergebnisse, die durch Studien an solchen destruierten Hefesystemen erhalten wurden, sind zweifellos unersetzlich für das Verständnis des Gärungsmechanismus auch der lebenden Hefezelle. Ich werde sie hier deshalb summarisch zusammenfassen. Sie bilden eine unentbehrliche Grundlage für die folgenden Ausführungen.

Die moderne Forschung innerhalb der Gärungschemie, basierend auf *Hardens* und *Neubergs* fundamentalen Einsätzen, ist durch das Bestreben charakterisiert, eine chemisch übersichtliche Auffassung von der Funktion der Phosphorsäure bei der Gärung zu gewinnen. Gegenwärtig sind es vor allem drei verschiedene Phosphorsäureester, die die Ausgangspunkte für Spekulationen in diesem Gebiet bilden, und die aus Gärungsmischungen mit mehr oder weniger destruierten Zymasesystemen isoliert werden konnten. Dies sind die von *Harden* und *Young*[1] 1905 gefundene Hexosediphosphorsäure, der von *Robison*[2] 1922 isolierte Ester, der sogenannte *Robison*-Ester, der aus einer Mischung von Hexosemonophosphorsäuren besteht, und schließlich die Glycerinsäuremonophosphorsäure, die ich 1929 aus Gärungsmischungen spezieller Art isolierte[3]. Es zeigte sich, daß letztgenannter Ester sozusagen als die Schlüsselsubstanz für das Verständnis der Rolle der Phosphorsäure bei der Gärung betrachtet werden darf. Aus seiner Bildung beim Kohlenhydratabbau ist es möglich, ein Schema für die alkoholische Gärung (ebenso wie für die Glykolyse im Muskel) aufzustellen, das auf eine

---

[1] *A. Harden* u. *W. J. Young*, Proc. Chem. Soc. **21**, 189, 1905. — [2] *R. Robison*, Biochem. J. **16**, 809, 1922. — [3] *R. Nilsson*, Sv. kem. tidskr. **41**, 169, 1929; Sv. Vet. Akad. Arkiv f. kemi **10A**, Nr. 7, 1930.

chemisch übersichtliche Art die Einzelheiten im Gärverlauf in den destruierten Zymasesystemen wiedergibt, die wir zur Zeit kennen. Einführend werde ich hier die Hauptzüge desjenigen Gärungsschemas behandeln, zu dem ich von diesem Ausgangspunkt aus kam[1]. Immerhin muß ich betonen, daß meine Auffassung nicht ohne Vorbehalt von allen Gärungschemikern geteilt wird, die später Gärungsschemata mit dieser Glycerinsäurephosphorsäurebildung als Ausgangspunkt aufgestellt haben. Es würde hier indessen zu weit führen, alle Auffassungen zu behandeln, die sich augenblicklich geltend machen wollen. Daß meine Darstellung subjektiv gefärbt sein muß, wird auch dadurch motiviert, daß die neuen Versuche, von denen ich hier später berichten will, unter Verwendung dieses Schemas als Arbeitshypothese ausgeführt worden sind. Um die Ergebnisse zu erklären, die hierbei erhalten wurden, muß ich ebenfalls mein Schema anwenden. Die gemachten Beobachtungen können nämlich natürlich in dieses Schema eingepaßt werden. Dagegen sehe ich keine Möglichkeit, sie mit z. B. der *Embden-Meyerhof*schen Auffassung[2] in Einklang zu bringen. Die weitere Entwicklung der neuen hochinteressanten und vielversprechenden Befunde von *Warburg*[3] und seiner Schule bleibt abzuwarten. Hoffentlich wird sich ein Weg finden lassen, die Befunde *Warburg*s und die hier mitzuteilenden Versuche in einheitlicher Weise zu verknüpfen.

Als ersten Schritt bei der Gärung wollen wir also nunmehr die Veresterung des Zuckers zu einer intermediären Hexosemonophosphorsäure betrachten.

Die Erfahrung, die wir nunmehr über die Oxydoreduktionserscheinungen in der Hefe besitzen, führen weiter zu der Annahme, daß diese intermediäre Hexosemonophosphorsäure danach einer oxydoreduktiven Umlagerung zwischen drittem und viertem Kohlenatom unterliegt, wonach sie in ein Molekül Glycerinaldehydphosphorsäure und in einen 3-Kohlenstoffkörper der Zusammensetzung $C_3H_6O_3$ zerfällt:

$$\begin{array}{c} \cdot HCOH \\ \| \\ COH \\ | \\ HOCH \\ | \\ HCOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2.O.PO_3H_2 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} C_3H_6O_3 \\ \\ \\ CHO \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2.O.PO_3H_2 \end{array} \qquad \text{(Formel I)}$$

[1] *R. Nilsson*, Biochem. Zeitschr. **258**, 198, 1933; Zeitschr. f. angew. Chem. **46**, 647, 1933; Sv. kem. tidskr. **45**, 129, 1933; **46**, 24, 1934. — [2] Siehe z. B. *O. Meyerhof* in Ergebnisse der Enzymforschung IV, 208, 1935 sowie S. 111 u. ff. in *K. Bernhauer*, Gärungschemisches Praktikum. Berlin, Jul. Springer, 1936. — [3] *O. Warburg* u. *W. Christian*, Biochem. Zeitschr. **287**, 291, 1936.

Die erwähnte Glycerinsäuremonophosphorsäure wird in Gärungsmischungen bei Zusatz von Acetaldehyd gebildet. Dieser tritt mit der intermediären Glycerinaldehydphosphorsäure in Reaktion, wobei er als Wasserstoffakzeptor wirkt und selbst zu Alkohol reduziert wird. Die Glycerinaldehydphosphorsäure dagegen wird zu Glycerinsäurephosphorsäure oxydiert.

$$\begin{matrix} CHO \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2.O.PO_3H_2 \end{matrix} + OH_2 + CH_3.CHO = \begin{matrix} COOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2.O.PO_3H_2 \end{matrix} + CH_3.CH_2.OH$$

(Formel II)

Wir kehren nun zu Formel (I) (S. 356) zurück. Für die weitere Umsetzung der gebildeten Glycerinaldehydphosphorsäure liegen verschiedene Möglichkeiten vor. Einmal kann sie unter Dephosphorylierung zu Alkohol und Kohlensäure vergoren werden. Hierauf wollen wir bei der Behandlung des intakten Gärungssystems zurückkommen. Dann gibt es aber noch die Möglichkeit, daß die Glycerinaldehydphosphorsäure zu Hexosediphosphorsäure kondensiert wird.

$$\begin{matrix} CH_2.O.PO_3H_2 \\ | \\ HOCH \\ | \\ CHO \\ \\ CHO \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2.O.PO_3H_2 \end{matrix} \rightleftarrows \begin{matrix} CH_2.O.PO_3H_2 \\ | \\ HOC- \\ | \\ HOCH \quad O \\ | \\ HCOH \\ | \\ HC- \\ | \\ CH_2.O.PO_3H_2 \end{matrix} \qquad \text{(Formel III)}$$

In der Tat ist dies auch das, was bei der Gärung in den destruierten Zymasesystemen mit diesem Abbauprodukt hauptsächlich geschieht. Zum Ausdruck kommt es in der Form der Gärungskurve. In einem weitgehend gestörten Zymasesystem hat diese nämlich das Aussehen, wie es die folgende schematische Darstellung zeigt (Abb. 1, S. 358).

Vorausgesetzt, daß die Gärungsmischung eine hinreichende Menge freien Phosphats enthält, wird die zugesetzte Glucose bis zu 50 % mit großer Geschwindigkeit vergoren. Dann erhält die Gärkurve einen Knick, und die Gärgeschwindigkeit ist danach bedeutend herabgesetzt. (Später werden wir dies auf noch schlagendere Art, als es hier der Fall ist, an experimentell gefundenen Kurven sehen.) Am Knickpunkt ist also die Hälfte der zugesetzten Glucose zu Alkohol und Kohlensäure vergoren worden. Die andere Hälfte liegt am Knickpunkt in veresterter Form vor. Nach Untersuchungen zunächst von *Harden*[1] und später

[1] Siehe z. B. *A. Harden* u. *F. R. Henley*, Biochem. J. **21**, 1216, 1927; **23**, 230, 1929.

von *Meyerhof* und von *Lohmann*[1] besteht dieser phosphorylierte Zucker aus Hexosediphosphorsäure. Die gebildete Hexosediphosphorsäure, der sogenannte *Harden*-Ester, vergärt dann längs des weiteren Teils der Gärungskurve mit einer Geschwindigkeit, die die maximale Gärgeschwindigkeit der nicht phosphorylierten Glucose bedeutend unterschreitet.

Harden faßt diese Beobachtungen in seiner bekannten Gleichung der alkoholischen Gärung in folgender Weise zusammen:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH + 2\,H_2O + C_6H_{10}O_4\,(PO_4R_2)_2.$$

Die Gleichung gibt einen formellen Ausdruck für das gefundene Verhältnis, daß in einem solchen System die eine Hälfte des zugesetzten Zuckers zu Alkohol und Kohlensäure vergoren wird, während die andere Hälfte keine Möglichkeit hat, auf die gleiche Art zu vergären, sondern in die schwer vergärbare Hexosediphosphorsäure umgewandelt wird. Bei der Garung wird also — ich möchte diese Gesetzmäßigkeit besonders betonen — die eine Hälfte des Zuckers anders umgesetzt als die andere.

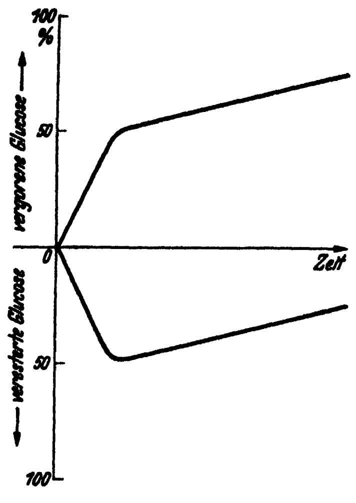


Abb. 1. Schematische Darstellung der Gärungskurve in einem weitgehend gestörten Zymasesystem.

Die Tatsache, daß wir mit zwei in Hinsicht auf die Vergärbarkeit verschiedenartigen Hälften des Zuckers rechnen müssen, wird verständlich, wenn das Hexosemolekül bei seinem Abbau über die intermediäre Hexosemonophosphorsäure zunächst einer asymmetrischen Aufspaltung unterliegt, derart, wie es in Formel (I) (S. 356) zum Ausdruck kommt.

Die untere Hälfte des Hexosemoleküls, die nach Sprengung der 6-Kohlenstoffkette in Form von Glycerinaldehydphosphorsäure auftritt, stabilisiert sich, wie früher schon erwähnt wurde, durch Kondensation zu Hexosediphosphorsäure. Diese Kondensation, die ich aus mehreren Gründen in meinem Schema postuliert habe, ist nunmehr durch Untersuchungen von *Barrenscheen* und *Beneschowsky*[2] und vor allem von *Meyerhof* und *Lohmann*[3] experimentell völlig gestützt. Nach letzt-

[1] *O. Meyerhof*, Biochem. Zeitschr. **183**, 176, 1927; *K. Lohmann*, ebenda **222**, 324, 1930; s. auch *F. Lipmann* u. *K. Lohmann*, ebenda **222**, 389, 1930. — [2] *H. K. Barrenscheen* u. *H. Beneschowsky*, Biochem. Zeitschr. **265**, 159, 1933. — [3] *O. Meyerhof* u. *K. Lohmann*, ebenda **271**, 101, 1934.

genannten Verfassern ist das Gleichgewicht, das Formel (III) (S. 357) wiedergibt, schon bei sehr geringer Konzentration der phosphorylierten Komponenten stark zu Gunsten der Hexosediphosphorsäurebildung verschoben.

Unter der Annahme, daß die obere Zuckerhälfte — nach Sprengung der 6-Kohlenstoffkette summarisch dargestellt durch $C_3H_6O_3$ — schnell vergoren wird, ist die *Harden*sche Gleichung offenbar erfüllt.

Was die Vergärung dieser oberen Hälfte des Hexosemoleküls betrifft, so mache ich mir keine endgültigen Vorstellungen davon, wie dies im einzelnen geschieht. Von eventuellen Intermediärstadien abgesehen, dürfte sie wohl aber grundsätzlich in einer Oxydation zu Brenztraubensäure[1], mit Acetaldehyd als Oxydationsmittel, bestehen. Ob diese Triosevergärung mit einer Dismutation zwischen zwei Triosemolekülen als einleitende Phase beginnt, um das erste Brenztraubensäuremolekül zu bilden — auf die gleiche Art also, wie es *Neuberg* für sein Methylglyoxal annimmt —, oder ob das einleitende Stadium unter Mitwirkung des Eigengehaltes der Hefe an Wasserstoffakzeptoren abläuft, läßt sich zunächst nicht entscheiden. Indessen hat man Beispiele dafür, daß eine Gärung auch nach Zusatz von Hexosediphosphorsäure als induktionsaufhebendes Mittel überhaupt nicht in Gang kommt, wenn man nicht wenigstens eine Spur von einem Wasserstoffakzeptor in Form von z. B. Acetaldehyd oder Methylenblau zusetzt. (Bei den sogenannten Äthiozymasepräparaten gilt dies ja als Regel.) Möglicherweise ist die Wirkung des zugesetzten Wasserstoffakzeptors auf diesen Punkt zurückzuführen.

Wenn auf die eine oder andere Weise das erste Brenztraubensäuremolekül gebildet worden ist, wird es von der Carboxylase der Hefe in ein Molekül Acetaldehyd und ein Molekül Kohlensäure zerlegt:

$$CH_3 . CO . COOH = CH_3 . CHO + CO_2.$$

Der gebildete Acetaldehyd reagiert mit einem weiteren Molekül $C_3H_6O_3$.

$$C_3H_6O_3 + CH_3 . CHO = CH_3 . CO . COOH + C_2H_5OH.$$

Dadurch entsteht ein Molekül Alkohol und ein neues Molekül Brenztraubensäure. Letztgenannte Substanz durchläuft wieder dieselben Reaktionen wie vorher. Der Kreislauf ist hiermit vollendet, und wir bekommen fortlaufend von jedem Molekül $C_3H_6O_3$ ein Molekül C_2H_5OH und ein Molekül CO_2.

[1] Daß bei der alkoholischen Gärung aus dem Zucker Brenztraubensäure gebildet wird, wurde zuerst von *A. Fernbach* u. *M. Schoen* nachgewiesen. *A. Fernbach* u. *M. Schoen*, C. r. Acad. Sci. **157**, 1478, 1913; **158**, 1719, 1914; **170**, 764, 1920; C. r. Soc. Biol. **86**, 15, 1922.

Es ist natürlich möglich, daß in die Reaktionskette für diese Triosevergärung weitere Intermediärstadien eingehen. Denkt man sich etwa, daß die Triose weiter phosphoryliert werden muß, um schnell vergoren werden zu können — z. B. in demselben Augenblick, in dem sie bei der Sprengung der 6-Kohlenstoffkette entsteht —, so muß die Triosephosphorsäure, die hier gebildet werden würde, einen anderen Charakter haben als die Glycerinaldehydphosphorsäure. Im Gegensatz zu dieser darf sie nicht zu Hexosediphosphorsäure kondensiert, und ihre Vergärung darf, wie wir später sehen werden, nicht durch einen Überschuß an Phosphorsäure in der Gärmischung gehindert werden. Ein wichtiger Spezialfall liegt bei Gärmischungen der Art vor, wie sie zur Darstellung von Glycerinsäurephosphorsäure angewendet werden, d. h. einer Gärmischung, die mit Acetaldehyd versetzt ist und mit soviel NaF, daß die Kohlensäureentwicklung unterdrückt ist. Es ist möglich, daß in diesem Fall die obere Hexosehälfte unter gleichzeitiger Oxydation phosphoryliert werden kann. Versuche, die von *Runnström* und Mitarbeitern angestellt wurden, können tatsächlich in dieser Richtung gedeutet werden, ebenso die aktivierende Einwirkung von Acetaldehyd auf die sogenannte Eigenphosphorylierung[2], d. h. die Bildung von Hexosemonophosphorsäure (im Fluoridversuch) aus dem Polysaccharidvorrat der Trockenhefe.

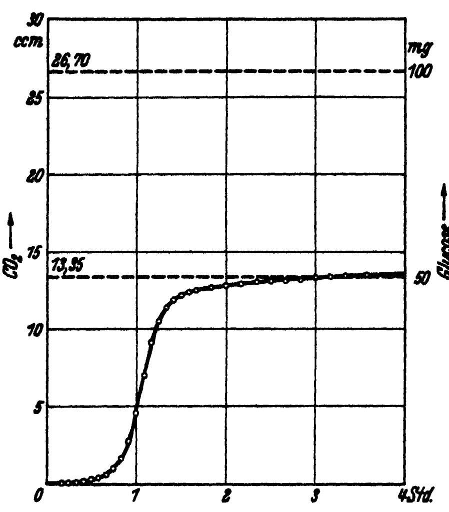


Abb. 2. Garung in Mazerationssaft von Hefe (stark destruiertes Zymasesystem). Garungsmischung (Gesamtvolumen 2 ccm): 1 ccm Mazerationssaft + 100 mg Glucose + Phosphat ($p_H = 6{,}4$), aquivalent[1] mit 100 mg Glucose.

Der Gärverlauf in den desorganisierten Zymasesystemen — den wir jetzt ziemlich eingehend erörtert haben — wird vor allem durch die sehr wichtige Gesetzmäßigkeit charakterisiert, daß der Zucker bei seiner Vergärung in zwei vom Gesichtspunkt der Gärung aus verschiedenartige Hälften zerlegt wird. In einer derartigen Gärmischung vergärt unter optimalen Bedingungen die eine Hälfte des zugesetzten Zuckers rasch, während sich die andere Hälfte zur schwer vergärbaren Hexosedi-

[1] Wir verstehen hierunter, daß die zugesetzte Phosphatmenge (auf PO_4''' bezogen) und die angegebene Zuckermenge in der Reaktionsmischung in äquimolekularem Verhältnis vorliegen. — [2] *R. Nilsson*, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. kemi 10 A, Nr. 7, 28, 1930.

phosphorsäure stabilisiert. In gewissen Fällen — wenn es sich um die Gärung in einem weit destruierten System, wie etwa in einem Mazerationssaft, handelt — können wir sagen, daß von der zugeführten Zuckermenge praktisch überhaupt nur die Hälfte zu Alkohol und Kohlensäure vergoren wird (Abb. 2, S. 360).

Die lebende Hefe dagegen vergärt die gesamte zugesetzte Zuckermenge mit großer Geschwindigkeit. In diesem Fall entsteht kein sogenannter Knick auf der Gärkurve. Sie zeigt erst dann eine Abnahme der Steigung, wenn der Zucker allmählich verschwindet und vollständig zu Alkohol und Kohlensäure vergoren ist (Abb. 3)[1].

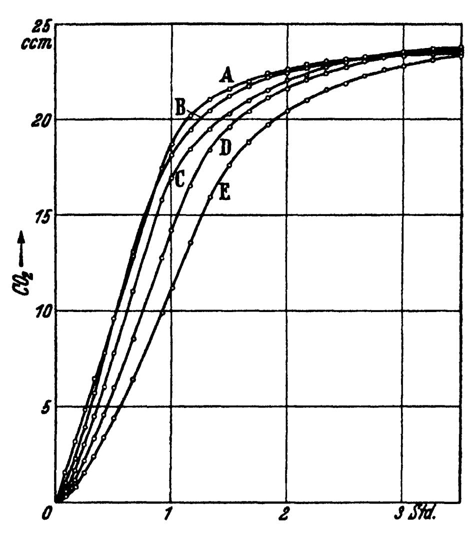


Abb 3 Gärung durch lebende Hefe (Biochem. Zeitschr. 286, 257, 1936). Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 1 ccm Hefesuspension[2] + 100 mg Glucose In den Proben A, B, C, D und E 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlosung (0,67 mol.; p_H = 6,4, 0,84 ccm aquivalent mit 100 mg Glucose) Reaktionstemperatur 30°.

Die Gesamtmenge der entwickelten Kohlensäure ist etwas niedriger als die aus der zugesetzten Zuckermenge berechnete, was seine Ursache teils darin hat, daß die Gärungen in Luft ausgeführt wurden, wobei gleichzeitig eine Atmung stattfindet, und teils darin, daß ein Teil des Zuckers wahrscheinlich zur Synthese von Zellsubstanz verwandt wird.

Es besteht also, wie aus den beiden vorhergehenden Abbildungen zu ersehen ist, ein sehr wesentlicher Unterschied zwischen der Gärung in lebenden Hefezellen einerseits und in destruierten Zymasesystemen andererseits. Wie anfangs betont wurde, muß aber das Ziel der Gärungschemie eben das sein, eine genaue Kenntnis über den Reaktionsverlauf in der lebenden Hefezelle zu erlangen. Durch Versuche an lebender Hefe selbst kommen wir aber, wie ich ebenfalls anfänglich erwähnte, zu keiner Beantwortung dieser Frage. Die Phosphatkonzentration in der Gärungsmischung z. B., die bei den destruierten Zymasesystemen für

[1] Abb. 3 bis 14 sind entnommen den Arbeiten von *R. Nilsson* u. *F. Alm*, Biochem. Zeitschr. 286, 254 und 373, 1936. — [2] Frische, untergärige Bierhefe. Trockengewicht (105° bis 110°) von 1 ccm der Hefesuspension etwa 60 mg.

den Gärverlauf ja völlig ausschlaggebend ist, hat, wie wir aus Abb. 3 ersehen können, nur einen sehr unbedeutenden Einfluß auf den Gärverlauf in der lebenden Hefe. Bei gesteigertem Zusatz von Phosphat zur Gärungsmischung tritt eine ziemlich unbedeutende Hemmung der Gärgeschwindigkeit ein, die sich über die ganze Gärkurve hin gleich stark bemerkbar macht. Durch Zusatz von Phosphat wird dagegen die Form der Gärkurve nicht grundsätzlich geändert. Ein Knick tritt auch bei großen Phosphatzusätzen nicht auf.

Wenn wir annehmen wollen, daß die Gesetzmäßigkeiten, die wir beim Studium der destruierten Zymasesysteme erkannt haben, von wesentlicher Bedeutung ebenfalls für den Gärverlauf in der lebenden Hefezelle sind, wird man offenbar eine Brücke zwischen den Ergebnissen schlagen müssen, die bei Versuchen mit der lebenden intakten Hefe und bei denen mit mehr oder weniger destruierten Zymasesystemen gewonnen wurden.

Man könnte sich denken, daß dies ausgeführt werden könnte, indem man ein Gärsystem verwendet, das so schonend behandelt worden ist, daß die Organisation der verschiedenen Teilfermente im Zymasesystem der lebenden Hefezelle nicht gestört worden ist, während dagegen die Permeabilitätsschwierigkeiten in der Membran der Hefezelle beseitigt worden sind. Wir hätten dann das intakte Zymasesystem der Hefezelle in einer derartigen Form zur Verfügung, daß es für chemische Angriffe sozusagen freigelegt worden ist.

Die weitere Darstellung gründet sich auf Versuche, die Kand. *Frithiof Alm* und ich an solchen Systemen ausgeführt haben. Was die Herstellung von Zymasesystemen dieser Art betrifft (die übrigens mit keinen größeren Schwierigkeiten verknüpft ist), so will ich hier nur kurz erwähnen, daß das Prinzip darin besteht, bei der Herstellung vom Trockenpräparat aus der frischen Unterhefe so schnell zu arbeiten, daß eine autolytische Zersetzung der Hefe nicht stattfinden kann.

Eine auf diese Art hergestellte Trockenhefe (die ich künftig als eine Trockenhefe mit intaktem Zymasesystem bezeichnen werde oder kürzer als eine intakte Trockenhefe) wird vor allem durch die auffallende Eigenschaft charakterisiert, daß sie ohne Phosphatzusatz zugesetzten Zucker längs einer geradlinigen Gärkurve *vollständig* vergären kann, einer Gärkurve also, die sich grundsätzlich durch nichts von der unterscheidet, die man mit lebender Hefe erhält.

Die Verhältnisse bei der Gärung mit einer derartigen intakten Trockenhefe sind in Abb. 4 gezeigt.

Wie Kurve A zeigt, verläuft die Gärung in der intakten Trockenhefe *ohne* besonderen Phosphatzusatz völlig gleichartig der in der lebenden Hefe. Ein sehr wesentlicher Unterschied zwischen lebender Hefe und

intakter Trockenhefe zeigt sich indessen in Versuchen *mit* Phosphatzusatz zur Gärungsmischung. Wir erinnern uns vom vorstehenden Diagramm her, daß Phosphatzusatz zur Gärungsmischung mit frischer Hefe sehr geringe Wirkung auf den Gärverlauf hat und vor allem das Aussehen der Gärkurve grundsätzlich nicht verändert. Ganz anders sind nun die Verhältnisse bei Versuchen mit intakter Trockenhefe. Bei vermehrtem Zusatz von Phosphat tritt hier eine immer mehr gesteigerte Hemmung der Gärgeschwindigkeit in Erscheinung. Auffallend ist, daß diese Hemmung erst in dem späteren Stadium der Gärung auftritt. Dadurch entsteht ein Knick auf der Gärkurve, der, wie es scheint, zu dem Punkt lokalisiert ist, wo die Hälfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist.

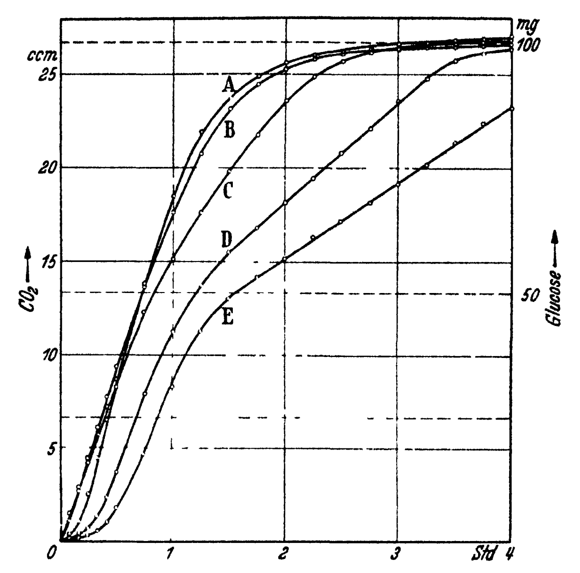


Abb. 4 Gärung durch Trockenhefe mit intaktem Zymasesystem (Biochem. Zeitschr. 286, 258, 1936). In jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung[1] In den Proben A, B, C, D und E 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung. (0,67 mol.; p_H = 6,4, 0,84 ccm äquivalent mit 100 mg Glucose). Reaktionstemperatur 30°.

Bevor wir uns mit der sehr anregenden Erscheinung weiter befassen, die diese Phosphatwirkung bedeutet, wollen wir zunächst Vergleiche anstellen zwischen den Verhältnissen in einer solchen Trockenhefe mit intaktem Zymasesystem und in desorganisierten Zymasesystemen, wie sie in Trockenhefen vorliegen, die auf weniger schonende Weise hergestellt sind, sowie in Apozymasepräparaten und in Mazerationssäften.

Das intakte Zymasesystem in einer Trockenhefe der oben beschriebenen Art ist, wie man sich denken kann, ein besonders empfindlicher Mechanismus. Schon eine Apozymase, die auf gewöhnliche Weise aus intakter Trockenhefe bereitet ist (also durch Auswaschen und darauffolgende Lufttrocknung) verhält sich wie ein typisch destruiertes Zymasesystem und kann daher höchstens die Hälfte des zugesetzten

[1] Wie immer 5%ige Lösung von hexosediphosphorsaurem Na.

Zuckers mit großer Geschwindigkeit vergären. Abb. 5 gibt den Gärverlauf mit einer solchen Apozymase bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen wieder. Zum Vergleich sind in die gleiche Figur die entsprechenden Kurven für die intakte Trockenhefe, aus der das Apozymasepräparat erhalten wurde, eingezeichnet worden.

Das Diagramm zeigt auf übersichtliche Art die sehr verschiedenartige Einwirkung, die Zusätze von Phosphat auf die beiden Zymasesysteme haben. Im intakten Zymasesystem ist es so, wie schon oben erwähnt wurde, daß bei fortschreitender Erhöhung der Phosphat-

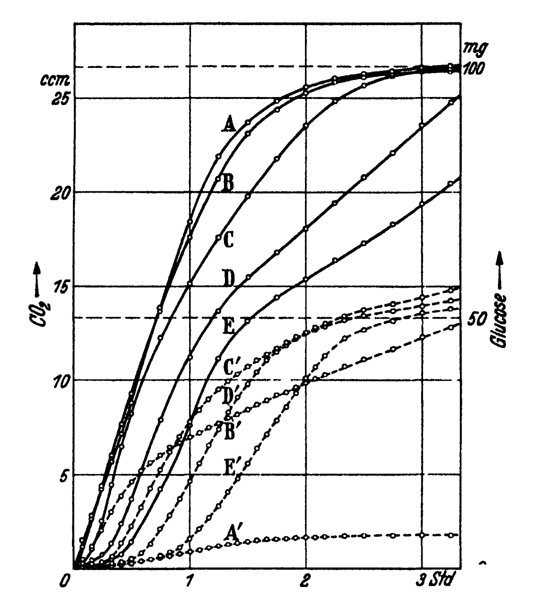


Abb. 5. Gärung mit Apozymase bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen (Biochem. Zeitschr. 286, 375, 1936).

Zu den Gärungsproben A bis E (Gesamtvolumen 2 ccm) · 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung.

In den Proben A, B, C, D und E 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol, p_H = 6,4).

Zu den Gärungsproben A' bis E' (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg Apozymase + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung + 0,25 mg Mg (als $MgCl_2$) + 0,2 ccm Co-Zymase [1].

In den Proben A', B', C', D' und E' 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., p_H = 6,4). Reaktionstemperatur 30°.

konzentration in der Gärungsmischung sich ein Knick ungefähr in der Mitte der Gärkurve mehr und mehr ausprägt. Die aus der intakten Trockenhefe dargestellte Apozymase dagegen wird von den Phosphatzusätzen in der Richtung aktiviert, wie es die *Harden*sche Gleichung fordert. Die Periode der schnellen Vergärung bekommt bei fortschreitender Vergrößerung der Phosphatkonzentration einen fortschreitend vergrößerten Bereich. In dieser schnellen Gärperiode gärt das Apozymasepräparat mit einer Geschwindigkeit, die die der intakten Hefe nicht wesentlich unterschreitet. Bei hinreichendem Phosphatzusatz entspricht die Gärung der schnellen Gärperiode jedoch nur ungefähr der Hälfte der zugesetzten Zuckermenge; eine weitere Erhöhung der Phosphatkonzentration vermag diesen Zustand nicht zu ändern.

Ein stark aktives, durch Pb- und Hg-Fällungen gereinigtes Präparat.

Im Zymasesystem der intakten Trockenhefe ist also durch das Auswaschen und die darauf folgende Trocknung eine durchgreifende Veränderung eingetreten. Man könnte hier vermuten, daß beim Auswaschen Aktivatoren entfernt worden sind, die zwar für eine schnelle Vergärung während der sogenannten Phosphatperiode nicht notwendig sind, jedoch unentbehrlich dann, wenn man die ganze Zuckermenge auf die Art schnell vergären will, wie es in der intakten Trockenhefe geschieht. Dies scheint allerdings nicht der Fall zu sein. Die Erklärung hierfür dürfte vielmehr die sein, daß während der Trocknung des Apozymasepräparats autolytische Vorgänge auftreten, die für den veränderten Charakter des Zymasesystems verantwortlich sind. Ein frisch bereitetes Apozymasepräparat nämlich, das ohne vorhergehende Trocknung angewendet wird, vermag zugesetzten Zucker vollständig zu vergären. Außerdem tritt auch in der Trockenhefe eine Destruktion völlig gleicher Natur ein, wenn sie während des Trocknungsprozesses der Autolyse ausgesetzt wird. Eine solche Trockenhefe verhält sich wie ein typisch destruiertes Zymasesystem. Die Gärkurven weisen einen sehr ausgeprägten Knick auf, dessen Lage durch die Phosphatkonzentration der Gärungsmischung bestimmt ist (Abb. 6). (Zum Vergleich sind in dasselbe Diagramm die entsprechenden Gärkurven für eine intakte Trockenhefe — ausgezogene Kurven — eingezeichnet worden.)

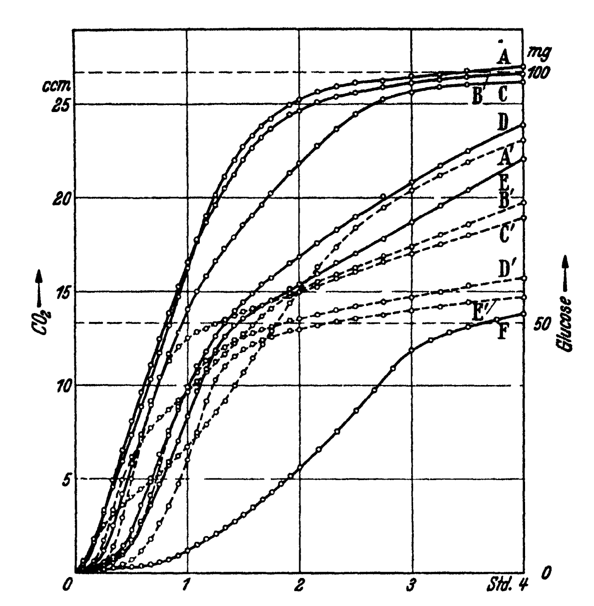


Abb. 6 Gärung durch autolysierte Trockenhefe (Biochem. Zeitschr. 286, 377, 1936).
Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung.
In den Proben A, B, C, D, E und F 200 mg intakte Trockenhefe + 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 und 2,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., p_H = 6,4).
In den Proben A', B', C', D' und E' 200 mg autolysierte Trockenhefe + 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., p_H = 6,4). Reaktionstemperatur 30°.

Auch eine nachfolgende gelinde Autolyse der intakten Trockenhefe — z. B. dadurch, daß man sie in wässeriger Suspension während einiger Stunden auf 35° hält — führt zum gleichen oder doch wenigstens sehr ähnlichen Ergebnis.

Es ist nun sowohl von theoretischem als auch von praktischem Interesse, daß, nachdem in der Hefe Autolyse eingetreten ist, die Zymase nunmehr in wasserlöslicher Form vorliegt. Sie kann schon mit kaltem Wasser extrahiert werden und wird hierbei in homogener Lösung erhalten. Die Gärkraft dieses Mazerationssaftes wird durch scharfes Zentrifugieren (Superzentrifuge, 15000 Umdrehungen) nicht geändert.

Es liegt hier ziemlich nahe, Spekulationen darüber anzustellen ob es vielleicht nicht so sein kann, daß der geradlinige Gärverlauf der intakten Hefe unter anderem sozusagen an eine heterogene Struktur

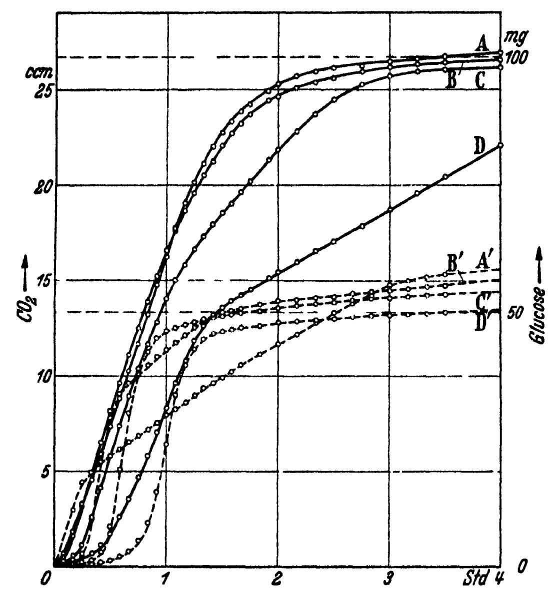


Abb. 7. Gärung im organisierten und desorganisierten Zymasesystem (in intakter Trockenhefe und im Mazerationssaft). (Biochem. Zeitschr. 286, 378, 1936)

Zu den Gärungsproben A bis D (Gesamtvolumen 2 ccm) 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung.

In den Proben A, B, C und D 0 bzw 0,25, 0,50 und 1,00 ccm Phosphatlosung (0,67 mol., p_H = 6,4)

Zu den Gärungsproben A' bis D' (Gesamtvolumen 2 ccm): 1 ccm Mazerationssaft + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung.

In den Proben A', B', C' und D' 0 bzw. 0,25, 0,50 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., p_H = 6,4). Reaktionstemperatur 30°.

des Enzymkomplexes in der Hefezelle gebunden ist, mit anderen Worten, daß die Organisation des Zymasesystems in der lebenden Hefezelle unter anderem auf einer bestimmten Lokalisierung der verschiedenen Teilfermente und Aktivatoren innerhalb der Zelle beruht. Bei Autolyse der Zelle wird deren Struktur zerstört, der Zymasekomplex geht in homogene Lösung, und die naturliche Organisation ist aufgehoben. Wir haben den in einem Mazerationssaft herrschenden Zustand.

Es ist klar, daß ein Verdacht wie dieser — sollte er richtig sein — zu einem auf eine Art ziemlich betrüblichen Schluß führt, nämlich dem, daß es in diesem Falle undenkbar wäre, in einer homogenen Lösung das intakte, organisierte Zymasesystem zu realisieren.

Ein Vergleich zwischen einem Mazerationssaft und der intakten Trockenhefe zeigt auf schlagende Weise den tiefgehenden Unterschied zwischen dem Gärverlauf in dem organisierten und in dem desorganisierten Zymasesystem (Abb. 7).

Bei der Gärung im Mazerationssaft ist die *Harden*sche Gleichung erfüllt. Eine schnelle Vergärung findet nur in dem Maße statt, wie die Gärmischung freies Phosphat enthält. Wenn dieses verbraucht ist, tritt auf der Gärkurve ein Knick auf, dessen Lage gemäß der *Harden*schen Gleichung aus der zu Anfang der Gärung vorhandenen Menge freien Phosphats berechnet werden kann. Wie wir später sehen werden, ist die Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Werten zufriedenstellend. Während der Periode der schnellen Gärung verläuft die Gärung im Mazerationssaft mit einer Geschwindigkeit, die derjenigen

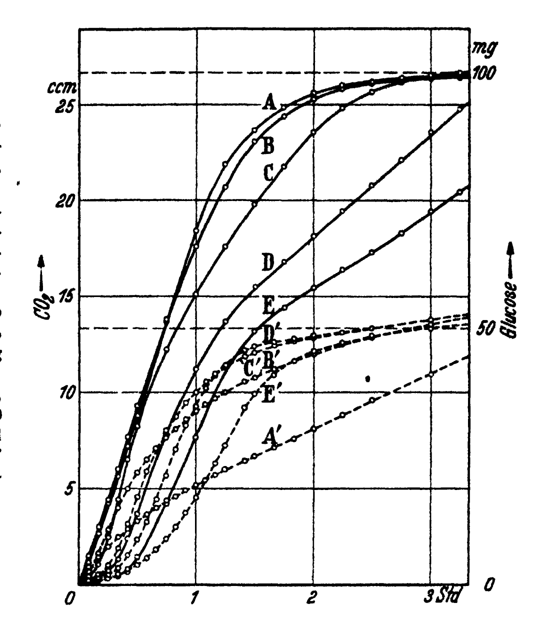


Abb. 8. Gärung durch intakte Trockenhefe mit und ohne Toluolzusatz (Biochem. Zeitschr. 286, 383, 1936).

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung.

In den Proben A, B, C, D und E 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., p_H = 6,4).

In den Proben A', B, C', D' und E' 0,2 ccm Toluol + 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., p_H = 6,4). Reaktionstemperatur 30°

in der intakten Trockenhefe nicht unterlegen ist. Ist der Knick erreicht, verläuft die Gärung mit erheblich reduzierter Geschwindigkeit. Sehr bemerkenswert ist, daß die Gärgeschwindigkeit weiter bis auf einen sehr geringen Wert sinkt, wenn eine Menge Kohlensäure entwickelt worden ist, die der vollständigen Vergärung von ungefähr der Hälfte der zugesetzten Zuckermenge entspricht. Auf dieses eigentümliche Verhalten werden wir später zurückkommen.

Bevor wir den Vergleich zwischen der intakten Trockenhefe und den desorganisierten Zymasesystemen verlassen, muß eine weitere Erscheinung erwähnt werden, nämlich die weitgehende Veränderung des intakten Zymasesystems, die durch Zusatz von Toluol hervorgerufen wird. Abb. 8 zeigt den Gärverlauf in einer intakten Trockenhefe bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen mit und ohne Toluolzusatz.

Wir sehen, daß das intakte Zymasesystem nach Toluolzusatz durchaus den Charakter eines typisch desorganisierten Systems annimmt. Es wird die gleiche Art von Kurven erhalten, wie wir sie etwa bei einem gewöhnlichen Apozymasepräparat finden. Zusatz von Phosphat hat nun die gleiche aktivierende Einwirkung wie immer, wenn es sich um destruierte Zymasesysteme handelt.

Eine Übersicht über den Gärverlauf im intakten Zymasesystem und in den desorganisierten Systemen zeigt schließlich Abb. 9.

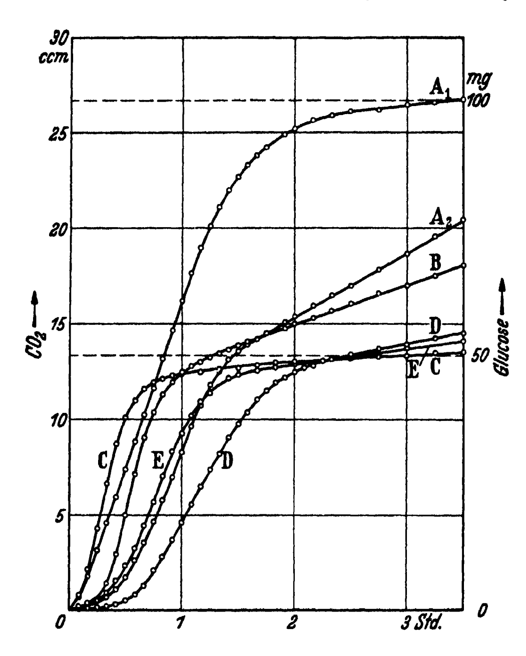


Abb. 9 Gärverlauf im intakten und im desorganisierten Zymasesystem (Biochem. Zeitschr. 286, 384, 1936).

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung.

In Probe C außerdem ein Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

In Probe A_1: 200 mg intakte Trockenhefe

In Probe A_2: 200 mg intakte Trockenhefe + 1 ccm Phosphatlosung[1].

In Probe B: 200 mg autolysierte Trockenhefe + 0,5 ccm Phosphatlosung.

In Probe C: 1 ccm Mazerationssaft + 0,5 ccm Phosphatlösung.

In Probe D 200 mg Apozymase + 0,75 ccm Phosphatlösung + 0,2 ccm Co-Zymase[2] + 0,25 mg Mg (als $MgCl_2$).

In Probe E: 200 mg intakte Trockenhefe + 0,75 ccm Phosphatlösung + 0,2 ccm Toluol.

Reaktionstemperatur 30°.

Die Gärversuche A_1, B, C, D und E wurden bei optimaler Phosphatkonzentration ausgeführt, d. h. für jeden besonderen Fall ist diejenige Phosphatkonzentration gewählt, die die beste Gärung in dem betreffenden System ergibt. Bei bis zu 50 % Vergärung der zugesetzten Zuckermenge verlaufen in allen Zymasesystemen die Gärkurven geradlinig und mit ungefähr gleicher Geschwindigkeit. Danach läuft allerdings nur in dem intakten Zymasesystem (Kurve A_1) die Gärung mit unverminderter Geschwindigkeit fort, bis vollständige Vergärung des Zuckers erreicht ist. Bei sämtlichen desorganisierten Zymasesystemen tritt dagegen ein mit zunehmender Desorganisation immer deutlicher werdender Knick in der Mitte der Gärkurve auf. Im Mazerationssaft (Kurve C) ist dieser Knick so ausgeprägt, daß man praktisch sagen kann, daß nur die Hälfte des

[1] 0,67 mol., $p_H = 6,4$. — [2] Ein stark aktives durch Pb- und Hg-Fällungen gereinigtes Präparat.

Zuckers zu Kohlensäure vergärt. Die Kurve A_2 gibt den Gärverlauf mit intakter Trockenhefe wieder, wenn die Gärungsmischung einen geringen Überschuß von Phosphat enthält. Wie man sieht, wirkt Phosphatzusatz auf den Gärverlauf im intakten Zymasesystem so ein, daß die Gärkurve ein ähnliches Aussehen annimmt wie die der destruierten Zymasesysteme.

Wir werden uns nun mit dieser eigenartigen Einwirkung von Phosphat auf den Gärverlauf in dem organisierten Zymasesystem befassen. Wir haben schon früher gewisse Anhaltspunkte dafür be-

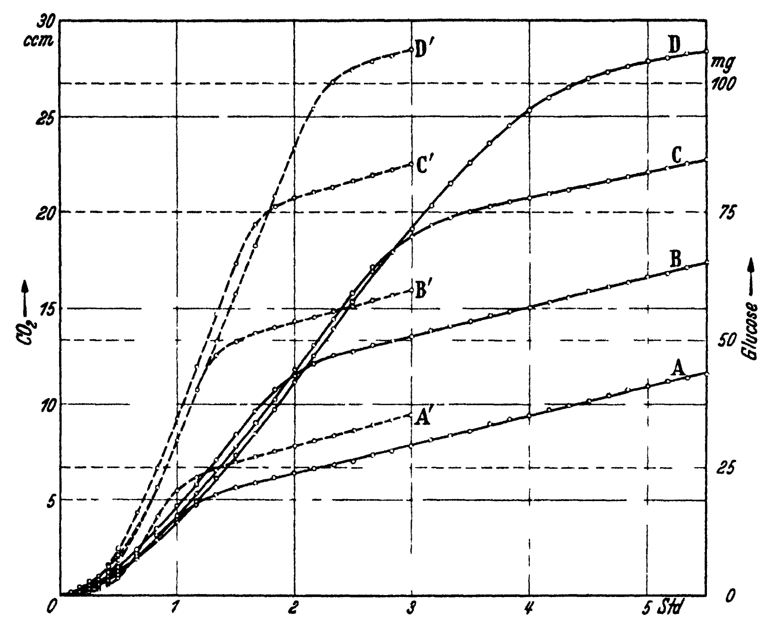


Abb 10 Garverlauf in intakter Trockenhefe bei konstantem hohen Phosphat- und variierendem Glucosegehalt der Gärmischung (Biochem Zeitschr 286, 264, 1936).

Zu jeder Garungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm) 200 mg intakte Trockenhefe + 0,1 ccm Zymophosphatlosung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlosung + eine Phosphatmenge äquivalent mit 200 mg Glucose In den Proben A bis D (sowie A' bis D') 50 bzw 100, 150 und 200 mg Glucose. Die Proben A, B, C und D bei 30°, A', B', C' und D' bei 40°.

kommen, daß der mehr oder weniger ausgeprägte Knick auf der Gärkurve, der im organisierten Zymasesystem durch Phosphatzusatz hervorgerufen wird, unabhängig von der Größe des Phosphatzusatzes dann auftritt, wenn die Halfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Wir müssen nun zwischen zwei grundsätzlich verschiedenen Fällen unterscheiden, dem, daß in der Gärungsmischung das Phosphat dem Zucker gegenüber im Überschuß oder in äquimolekularer Menge zugesetzt ist, und dem, daß weniger Phosphat als Zucker vorliegt.

Wir behandeln zunächst den ersten Fall. Abb. 10 (S. 369) zeigt den Gärverlauf in einer intakten Trockenhefe bei hoher, konstanter Phosphatmenge und variierender Glucosemenge in der Gärungsmischung. Die Versuche sind teils bei 30° (ausgezogene Kurven), teils bei 40° (gestrichelte Kurven) ausgeführt worden.

Bei jeder Glucosemenge tritt auf der Gärkurve ein Knick auf, wenn ungefähr die Hälfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Aus der Abbildung geht hervor, daß der Knick bei 30° weniger scharf ausgeprägt ist als bei 40°. Der Versuch zeigt schlagend, daß man bei der Gärung mit einer Aufteilung der Glucose in zwei vom Gärungsstandpunkt aus nicht gleichwertige Hälften rechnen muß. Die Vergärung der einen Hälfte ist in typischer Weise durch Phosphat zu hemmen, während die der anderen nicht oder jedenfalls nur in sehr geringem Grade durch Phosphat zu hemmen ist. Zwar tritt auch in den desorganisierten Zymasesystemen bei Phosphatüberschuß in der Gärmischung ein Knick auf der Gärkurve auf, wenn die Hälfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Dann hat indessen der Phosphatzusatz eine *Aktivierung* der Gärung herbeigeführt, und die schnelle Vergärung von nur der Hälfte der Zuckermenge, die dadurch erzielt wird, ist die beste Gärung, die wir im destruierten Zymasesystem überhaupt erhalten können. Im intakten Zymasesystem, das wir hier (Abb. 10) studieren, liegt indessen ohne Phosphatzusatz eine vollständige Vergärung des Zuckers vor, und der Knick auf der Gärkurve entsteht hier auf Grund einer *Phosphathemmung*.

Wenn wir von unserer Auffassung über die Vergärung der intermediären Hexosemonophosphorsäure ausgehen (Formel I, S. 356), können wir dieses Verhalten auf folgende Art erklären. Eine intakte Trockenhefe, die also ohne besonderen Phosphatzusatz den zugesetzten Zucker längs einer geradlinigen Gärkurve vollständig vergärt, muß offenbar die Fähigkeit besitzen, die C_3-Körper, die bei der Aufspaltung der intermediären Hexosemonophosphorsäure entstehen, beide mit großer Geschwindigkeit zu vergären. Der phosphorylierte 3-Kohlenstoffkörper muß dabei dephosphoryliert werden. Bei erhöhter Phosphatkonzentration in der Gärmischung wird diese Dephosphorylierung erschwert und damit auch die Vergärung des halben Zuckermoleküls. Wenn die Gärmischung wie im eben beschriebenen Falle einen Überschuß an Phosphat enthält, so liegt die Möglichkeit einer quantitativen Kondensation der intermediären Glycerinaldehydphosphorsäure und damit der halben Zuckermenge zur schwer vergärbaren Hexosediphosphorsäure vor. (Selbst in einer intakten Trockenhefe vergärt nämlich die *Harden-Young*sche Hexosediphosphorsäure mit unbedeutender Geschwindigkeit.) Der bei 50% Vergärung des Zuckers auftretende Knick wird unter diesen Annahmen also sofort verständlich.

Eine solche Möglichkeit zur Stabilisierung der Hälfte der zugesetzten Zuckermenge zu Hexosediphosphorsäure liegt dagegen natürlich nicht vor, wenn weniger Phosphat als Zucker in der Gärmischung vorhanden ist. Und doch tritt auch in einem solchen System — unter gewissen Umständen — ein ausgeprägter Knick auf der Gärkurve auf, wenn die Hälfte des zugesetzten Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Von ausschlaggebender Bedeutung ist indessen in diesem Falle die Temperatur, bei der die Gärung ausgeführt wird. Abb. 11 stellt eine Reihe Gärversuche mit intakter Trockenhefe bei 30⁰ und 40⁰ dar. Die Gärmischungen enthalten eine konstante Zuckermenge und variierende Phosphatmengen.

Bei 30⁰ verläuft die Gärung vollständig und geradlinig ohne Zusatz von Phosphat (Kurve A). Bei Zusatz einer zur Zuckermenge äquivalenten Menge Phosphat erhalten wir einen Knick in der Mitte der Gärkurve (Kurve B). Dies stimmt mit der vorhergehenden Abb. 10 (S. 369) überein. Im Ansatz C, in dem der Phosphatgehalt nur halb so groß ist, tritt kein ausgeprägter Knick auf der Gärkurve auf. Der Phosphatzusatz verursacht allerdings auch hier eine Hemmung der Gärgeschwindigkeit, und es scheint, als setze die Hemmung hauptsächlich in der zweiten Hälfte der Gärung ein.

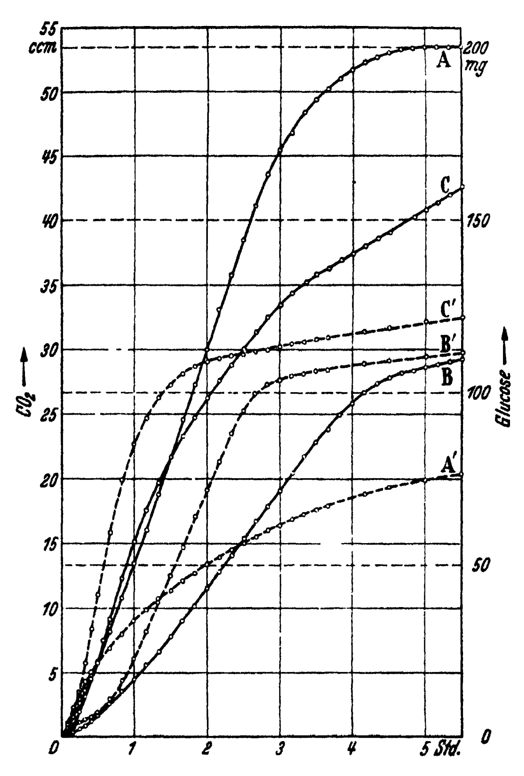


Abb. 11. Gärverlauf in intakter Trockenhefe bei 30⁰ und bei 40⁰ (Biochem. Zeitschr. 286, 261, 1936).

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 200 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

In den Proben B und B′ Phosphat äquivalent mit 200 mg Glucose, in C und C′ Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose. Die Proben A, B und C bei 30⁰, A′, B′ und C′ bei 40⁰.

Bei 40⁰ ist der Charakter der Gärung mit intakter Trockenhefe vollständig verändert. Der für diese Trockenhefe bei 30⁰ charakteristische geradlinige Gärverlauf bei Abwesenheit von Phosphat kommt

nicht mehr zum Vorschein. Allerdings ist die Anfangsgeschwindigkeit bei der höheren Versuchstemperatur etwa gleich groß wie die bei 30° beobachtete. Eine geradlinige Gärkurve erhält man aber nicht. Die vom Anfang an hohe Gärgeschwindigkeit nimmt schnell und kontinuierlich längs der ganzen Gärkurve ab (Kurve A'). Bei Zusatz von Phosphat wird die Gärung stark aktiviert; ist aber dann die Hälfte des zugesetzten Zuckers zu Kohlensäure vergoren, tritt ein deutlich ausgeprägter Knick auf der Gärkurve auf. Es ist nun auffallend, daß die Lage des Knickpunktes bei den verschiedenen Phosphatkonzentrationen dieselbe ist. Im Ansatz B', wo Phosphat in äquivalenter Menge zum Zucker zugesetzt ist, ist ja ein Knick mitten auf der Gärkurve nur das, was man erwartet. Beim Knickpunkt liegt dann die Hälfte der zugesetzten Zuckermenge in Form von Hexosediphosphorsäure stabilisiert vor. Im Ansatz C' dagegen, wo nur halb so viel Phosphat zugesetzt worden ist, kann höchstens ein Viertel der zugesetzten Zuckermenge zur schwer vergärbaren Hexosediphosphorsäure stabilisiert werden, und dennoch tritt auch hier der Knick auf, wenn die Hälfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Wir haben hier wieder einen wesentlichen Unterschied im Gärverlauf der destruierten Systeme und der intakten Trockenhefe. In den destruierten Systemen bestimmt der Phosphatgehalt der Gärmischung die Lage des Knickpunktes. In der intakten Trockenhefe tritt bei hoher Gärtemperatur ein Knick auf der Gärkurve auf, dessen Lage durch die Zuckermenge

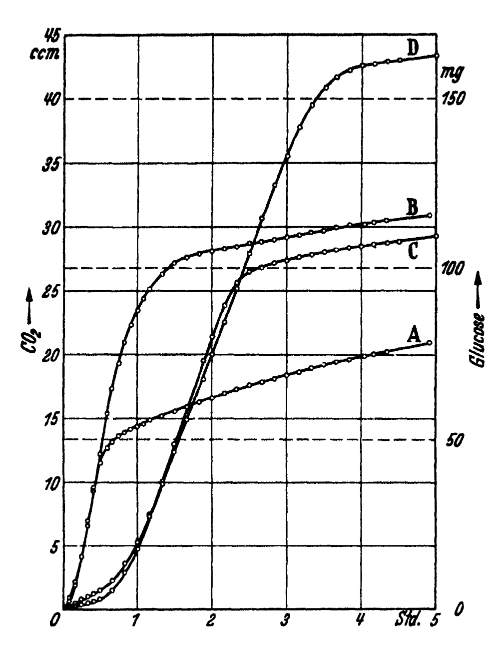


Abb. 12. Garverlauf in intakter Trockenhefe bei verschiedenen Glucose- und Phosphatgehalten (Biochem. Zeitschr. 286, 262, 1936).

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 1 Tropfen 2,5%ige Acetaldehydlösung.

In der Probe A 100 mg Glucose + Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose, in Probe B* 200 mg Glucose + Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose, in Probe C 200 mg Glucose + Phosphat äquivalent mit 200 mg Glucose und in Probe D 300 mg Glucose + Phosphat äquivalent mit 200 mg Glucose. Reaktionstemperatur 40°

* Zu den Proben A und B außerdem 0,1 ccm Zymophosphatlösung. In besonderen Versuchsreihen haben wir uns davon überzeugt, daß durch Zymophosphatzusatz nur die Angärung, nicht aber die Gärkurve im übrigen beeinflußt wird.

in der Gärmischung bestimmt ist. In diesem System tritt unabhängig von der Phosphatmenge der Knick auf, wenn die Hälfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist.

Wir wollen dieses auffallende Verhalten weiter in der nebenstehenden Abbildung zeigen (Abb. 12).

Die Gärkurve A für 100 mg Glucose mit einer der Zuckermenge äquivalenten Menge Phosphat hat ihren Knick bei 50 % Vergärung von 100 mg Glucose; in diesem Falle besteht also Übereinstimmung mit der Gleichung von *Harden*. Wenn wir indessen die Glucosemenge bei gleichem Phosphatgehalt verdoppeln, also auf 200 mg erhöhen, so tritt der Knick erst auf, wenn doppelt so viel Kohlensäure wie im vorigen Fall entwickelt worden ist (Kurve B). Der Knick liegt jetzt bei 50 % Vergärung von 200 mg Glucose. Ein weiterer Zusatz von Phosphat verändert nun, bei gleicher Zuckermenge (200 mg), nicht wesentlich die Lage des Knickpunktes (Kurve C). Wird indessen bei letztgenannter Phosphatkonzentration die Glucosemenge auf 300 mg erhöht, so verschiebt sich der Knickpunkt wieder aufwärts und liegt nun bei etwa 50 % Vergärung von 300 mg Glucose (Kurve D).

In Hinsicht auf den Phosphatumsatz in den Gärmischungen ist unser Versuchsmaterial noch in hohem Grade unvollständig. Nach den bisher erhaltenen Ergebnissen ist indessen bei dem soeben beschriebenen Gärungstyp das zugesetzte Phosphat beim Knickpunkt der Gärkurve praktisch vollständig verestert und liegt in der Hexosediphosphatfraktion vor. Eine weitere systematische Prüfung ist hier jedoch notwendig.

Wir wollen nunmehr versuchen, eine Erklärung für den eigenartigen Gärverlauf zu geben, den wir bei der intakten Trockenhefe bei 40° festgestellt haben. Wie früher gehen wir von unserer Anschauung über die Vergärung der intermediären Hexosemonophosphorsäure aus (Formel I, S. 356). Wenn diese, wie wir annehmen, in eine phosphorylierte und eine nicht phosphorylierte Triose aufgespalten wird, wird es begreiflich, daß wir unabhängig von der Phosphatmenge einen Knick bei 50 % Vergärung des Zuckers bekommen. Aus dem Hexosemolekül haben wir jetzt zwei untereinander verschiedene Hälften erhalten, und es läßt sich denken, daß unter den gegebenen Verhältnissen (Gärtemperatur 40°) die eine dieser Hälften schnell, die andere dagegen überhaupt nicht vergoren werden kann.

Eine natürliche Annahme ist die, daß unter den gegebenen Verhältnissen nur der nicht phosphorylierte 3-Kohlenstoffkörper vergoren werden kann, während der phosphorylierte 3-Kohlenstoffkörper keinen Anlaß zur Kohlensäurebildung gibt. Bei der hohen Phosphatkonzentration in der Gärmischung dürfte die Dephosphorylierung der phosphorylierten Triose (Glycerinaldehydphosphorsäure) erschwert und dadurch die Tendenz der Kondensation zur Hexosediphosphorsäure verstärkt

werden. Tatsächlich liegt ja auch beim Knickpunkt das zugesetzte Phosphat in Form von Hexosediphosphorsäure vor. Eine Dephosphorylierung des intermediären Triosephosphats muß jedoch in gewissem Maße geschehen, um die 50 %ige Vergärung des Zuckerüberschusses zu ermöglichen. Gewisse Umstände, die ich jetzt nicht näher berühren kann, deuten darauf hin, daß diese Dephosphorylierung durch eine Umesterung zwischen dem Triosephosphat und der Glucose zustande kommt. Die Triose, die aus dem auf diese Weise dephosphorylierten Triosephosphat entsteht, wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht schnell vergoren gemäß der Auffassung vom Gärmechanismus, die wir hier vertreten. Bei der Deutung davon müssen wir die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß bei der hohen Gärtemperatur eine schnelle Destruktion des Zymasesystems stattfindet, und daß das so erhaltene System nicht länger die Triose zu vergären vermag, die bei der Dephosphorylierung des intermediären Triosephosphats entsteht. So verhält es sich auch tatsächlich. Nach der Behandlung bei der hohen Gärtemperatur hat das Zymasesystem seine Fähigkeit verloren, den Zucker vollständig und mit hoher Geschwindigkeit zu vergären. Selbst wenn die Gärtemperatur auf 30° herabgesetzt wird, vergärt eine zugesetzte Zuckermenge nur zur Hälfte mit großer Geschwindigkeit.

Um diese Auffassung so verständlich wie möglich zu machen, wollen wir uns einer formelmäßigen Betrachtungsweise bedienen. Angenommen z. B., daß die Gärmischung die gleiche Zusammensetzung habe wie der Ansatz D der vorhergehenden Abb. 12 und also von Anfang an 3 Mole Glucose auf 2 Mole Phosphorsäure enthält, haben wir beim Knickpunkt dann folgende Beziehungen:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,H_3PO_4 = 2\,C_6H_{11}O_5 . O . PO_3H_2 + 2\,H_2O$$
$$2\,C_6H_{11}O_5 . O . PO_3H_2 = 2\,C_3H_6O_3 + 2\,C_3H_5O_2 . O . PO_3H_2$$
$$C_6H_{12}O_6 + C_3H_5O_2 . O . PO_3H_2 = C_6H_{11}O_5 . O . PO_3H_2 + C_3H_6O_3$$
$$C_6H_{11}O_5 . O . PO_3H_2 = C_3H_6O_3 + C_3H_5O_2 . O . PO_3H_2$$
$$2\,C_3H_5O_2 . O . PO_3H_2 = C_6H_{10}O_4\,(OPO_3H_2)_2$$

$$3\,C_6H_{12}O_6 + 2\,H_3PO_4 = \underset{\text{vergärbar}}{3\,C_3H_6O_3} + C_6H_{10}O_4\,(OPO_3H_2)_2 + \underset{\text{nicht vergärbar}}{C_3H_6O_3} + 2\,H_2O$$

Nach diesem Schema, das also quantitativ über die gefundenen Verhältnisse berichtet, haben wir in einer derartigen Gärungsmischung beim Knickpunkt der Gärkurve ein Zuckerdefizit bis zu $^1/_6$ der zugesetzten Menge Glucose, die nicht zu Kohlensäure vergoren und auch nicht zur Hexosediphosphorsäure stabilisiert worden ist. Gemäß der Auffassung, die im Schema zum Ausdruck kommt, besteht dieses Defizit aus einer unter den herrschenden Umständen unvergärbaren Triose. Gewiß hindert indessen nichts, daß die primär entstandene Triose sich durch sekundäre Reaktionen stabilisiert.

Wird der Zuckerüberschuß noch größer gewählt als in dem eben beschriebenen Falle, so erhöht sich der prozentuale Betrag des am Knickpunkt vorfindlichen Zuckerdefizits. Für eine Gärmischung der gleichen Zusammensetzung wie Ansatz B der vorstehenden Abbildung, die von Anfang an also doppelt so viele Mole Glucose als Phosphorsäure enthält, gilt am Knickpunkt folgende Gleichung:

$$4\,C_6H_{12}O_6 + 2\,H_3PO_4 = \underset{\text{vergärbar}}{4\,C_3H_6O_3} + C_6H_{10}O_4(OPO_3H_2)_2 + \underset{\text{nicht vergärbar}}{2\,C_3H_6O_3} + 2\,H_2O$$

In diesem Falle ist am Knickpunkt die Hälfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren und ein Viertel zu Hexosediphosphorsäure stabilisiert worden. Nicht weniger als ein Viertel der zugesetzten Zuckermenge liegt in unveresterter und unvergärbarer Form vor.

Betreffs der chemischen Natur dieses Zuckerdefizits kommen wir, wie bereits erwähnt, zu der Auffassung, daß es aus einer Triose oder vielleicht aus einer irgendwie umgewandelten Triose besteht. Hier ist allerdings wieder unser Versuchsmaterial in hohem Grade unvollständig. Bisher haben wir festgestellt, daß eine solche Gärmischung am Knickpunkt eine stark reduzierende Substanz enthält, die nicht Glucose ist. Die Isolierung dieser Substanz ist in Angriff genommen.

Bei tieferer Versuchstemperatur (30°) verläuft, wie oben gezeigt wurde (Abb. 11, S. 371), im intakten Zymasesystem die Gärung auf ganz andere Weise wie bei 40°. Bei 30° vergärt ohne Phosphatzusatz der zugesetzte Zucker vollständig längs einer geradlinigen Gärkurve. Bei Überschuß an Phosphat in der Gärmischung tritt — wie bei der höheren Versuchstemperatur — ein ausgeprägter Knick auf der Gärkurve auf, wenn die Hälfte des Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Bei Mangel an Phosphat tritt dagegen ein grundsätzlicher Unterschied im Garverlauf bei 30° und 40° auf. Auch bei 30° verursacht ein kleiner Phosphatzusatz eine Hemmung der Gärgeschwindigkeit, die, wie es scheint, erst etwa in der Mitte der Gärkurve eintritt. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei 40°, wo die Gärung praktisch aufhört, wenn die Hälfte des Zuckers vergoren ist, läuft die Gärung bei 30° fort, wenn auch mit erheblich verminderter Geschwindigkeit, bis der Zucker vollständig zu Kohlensäure vergoren ist. Über den Einfluß des Phosphats auf den Gärverlauf bei 30° machen wir uns folgende Vorstellung. Im Zymasesystem ist bei dieser Temperatur das Prinzip wirksam, das für die schnelle Vergärung der aus dem intermediären Triosephosphat gebildeten Triose notwendig ist. Wenn der Gärmischung kein Phosphat zugesetzt wird, geschieht die Dephosphorylierung des Triosephosphats mit großer Geschwindigkeit, und die Gärkurve verläuft daher geradlinig, bis die gesamte zugesetzte Zuckermenge zu Kohlensäure vergoren ist. Bei fortschreitend erhöhter Phosphatkonzentration in der Gärmischung wird die Dephosphorylierung des Triosephosphats immer mehr ver-

langsamt und damit auch die Vergärung des halben Zuckermoleküls. Offenbar muß unter diesen Verhältnissen der Knickpunkt auf der Gärkurve weniger deutlich markiert und seine Lage weniger gut definiert sein.

Zum Schluß wollen wir kurz zu den Verhältnissen in den typisch destruierten Zymasesystemen zurückkehren. Ich erwähnte bei der Besprechung des Gärverlaufs im Mazerationssaft, daß wir außer dem Knickpunkt auf der Gärkurve, der in diesem System durch den Gehalt an Phosphat in der Gärmischung gemäß der *Harden*schen Gleichung bestimmt ist, mit einem weiteren zu rechnen haben, der dann auftritt, wenn die Hälfte des zugesetzten Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Die nebenstehende Abbildung zeigt dies recht gut (Abb. 13).

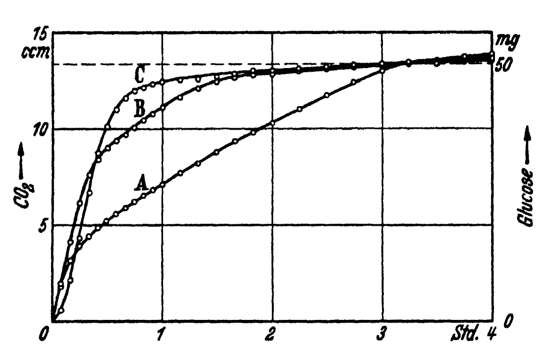


Abb. 13. Gärverlauf im Mazerationssaft (Biochem. Zeitschr. 286, 379, 1936).
Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 1 ccm Mazerationssaft + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.
In den Proben A, B und C 0 bzw 0,25 und 0,50 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., p_H = 6,4). Reaktionstemperatur 30°.

Wird im Gäransatz die Zuckermenge bei konstantem Phosphatgehalt stark variiert, so kommt diese Gesetzmäßigkeit vielleicht noch deutlicher zum Ausdruck.

Die Abb. 14 zeigt den Gärverlauf bei 40° im Mazerationssaft, wenn sowohl Zucker- als auch Phosphatgehalt stark variieren. Zum Vergleich hierzu sind die entsprechenden Gärkurven für intakte Trockenhefe eingezeichnet.

Den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe brauchen wir jetzt nicht weiter zu berühren, da wir ihn ja oben eingehend erörtert haben.

Im Mazerationssaft ist die Lage des ersten Knickpunktes auf der Gärkurve durch die *Harden*sche Gleichung bestimmt. Die Berechnung ergibt, daß der erste Knickpunkt in den Ansätzen A′, B′, C′ und D′ bei einer entwickelten Kohlensäuremenge von 13,1, 13,1, 26,7* und 27,0 ccm CO_2 eintreten muß. Es besteht gute Übereinstimmung zwischen diesen Werten und den experimentell gefundenen. Nach Auftreten des ersten Knickes schreitet bei Überschuß an Zucker in der

* Im Ansatz C′ befindet sich Phosphat gegenüber Zucker etwas im Überschuß. Die Lage des Knickpunktes wird in diesem Falle deshalb aus der Kohlensäuremenge berechnet, die bei 50% Vergärung des Zuckers erhalten wird.

Gärmischung die Gärung mit verminderter Geschwindigkeit fort. Ist ungefähr die Hälfte des zugesetzten Zuckers zu Kohlensäure vergoren, sinkt die Gärgeschwindigkeit weiter. Einen scharf markierten Knick können wir hier nicht erwarten, da ja die Gärgeschwindigkeit schon nach Passieren des ersten Knickpunktes der Gärkurve ziemlich gering ist.

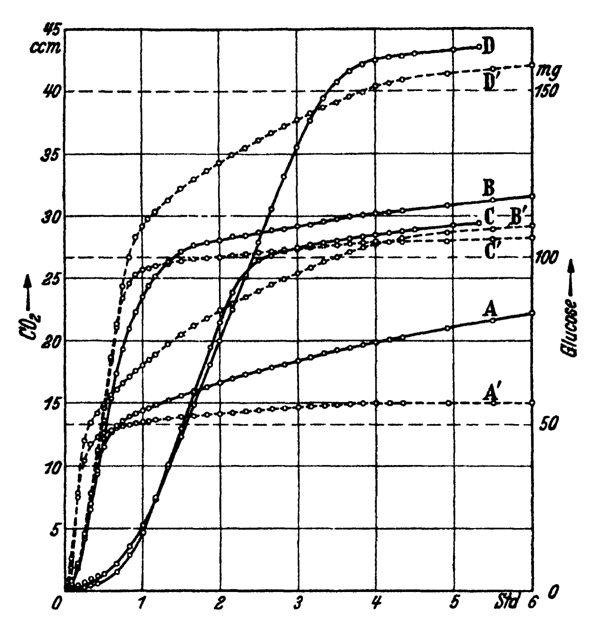


Abb. 14. Gärverlauf im Mazerationssaft mit stark variierendem Zucker- und Phosphatgehalt (Biochem. Zeitschr. 286. 381, 1936).

Der zu diesem Versuch benutzte Mazerationssaft enthält je ccm 14,0 mg P_2O_5 (ausschließlich als Orthophosphat). Der Phosphatgehalt des Mazerationssaftes wird bei der Berechnung der in den Reaktionsmischungen vorhandenen Phosphatmenge berücksichtigt.

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm), 0,1 ccm Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung (in den Proben C und D jedoch kein Zymophosphatzusatz).

In den Proben A, B, C und D 200 mg intakte Trockenhefe; in A', B', C' und D' 1 ccm Mazerationssaft.

In Probe A:	100 mg	Glucose	+ Phosphat äquivalent mit	100 mg	Glucose
„ „ B:	200 „	„	+ „ „ „	100 „	„
„ „ C:	200 „	„	+ „ „ „	200 „	„
„ „ D:	300 „	„	+ „ „ „	200 „	„
„ „ A':	100 „	„	Phosphatgehalt	38,6 mg	P_2O_5
„ „ B':	200 „	„	„	38,6 „	„
„ „ C':	200 „	„	„	79,6 „	„
„ „ D':	300 „	„	„	79,6 „	„

Reaktionstemperatur 40°.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Gärverlauf im Mazerationssaft insofern dem ähnelt, den man mit einer intakten Trockenhefe bei hoher Gärtemperatur (40°) erhält, als die Gärung praktisch aufhört, wenn die Hälfte des zugesetzten Zuckers zu Kohlensäure vergoren ist. Unserer Ansicht nach beruht dies darauf, daß dem Mazerationssaft

das Prinzip fehlt, das für eine schnelle Vergärung der Triose, die aus dem intermediären Triosephosphat entsteht, notwendig ist, das gleiche Prinzip, das in der intakten Trockenhefe schnell verdirbt, wenn der Gäransatz hoher Temperatur ausgesetzt wird. In beiden Fällen machen wir autolytische Vorgänge für diese Destruktion des Zymasesystems verantwortlich. Im Mazerationssaft kommt außerdem hinzu, daß wir bei zu wenig Phosphat in der Gärmischung einen ersten Knick auf der Gärkurve erhalten, dessen Lage durch die *Harden*sche Gleichung bestimmt ist. Nach Eintritt dieses Knickes verläuft die Gärung bis zu 50 %iger Umsetzung des zugeführten Zuckers mit stark verminderter Geschwindigkeit. Die Erklärung für dieses Verhalten suchen wir in einer verminderten Fähigkeit des Systems, die Dephosphorylierung des intermediären Triosephosphats bzw. die Umesterung zwischen diesem und dem in der Gärmischung befindlichen, noch nicht umgesetzten Zucker zu bewerkstelligen.

Hiermit habe ich meine Darstellung abgeschlossen, die den Zweck hatte, die Verschiedenheiten zu beleuchten zwischen dem Gärverlauf einerseits in den destruierten Zymasesystemen, die ja bisher hauptsächlich als Versuchsobjekt bei Untersuchungen über die alkoholische Gärung dienten, und andererseits dem tatsächlichen Verlauf der Gärung in der lebenden Zelle. So wie ich das Problem sehe, ist die wichtigste Gesetzmäßigkeit, die in den typisch destruierten Zymasesystemen sowohl als auch in dem intakten Zymasesystem festgestellt worden ist, die, daß der Zucker bei seiner Vergärung in zwei vom Standpunkt der Vergärbarkeit aus nicht gleichwertige Hälften aufgeteilt wird. Diesem Verhalten lege ich vollkommen grundlegende Bedeutung bei, wenn es sich um eine Erörterung der integrierenden Teilreaktionen im Gärmechanismus handelt. In den meisten Schemata, die heutzutage geläufig sind, ist, soweit ich sehen kann, nicht hinreichend Rücksicht hierauf genommen worden. Klar erkannt wird die Bedeutung der oben erwähnten Gesetzmäßigkeit indessen in den sehr bemerkenswerten Arbeiten von *Kluyver* und seiner Schule[1].

Der Verfasser ist der Stiftung „Therese och Johan Anderssons Minne“ für gewährte materielle Beihilfe zu bestem Dank verpflichtet.

[1] Siehe hierzu z. B. die zusammenfassende Arbeit von *A. Kluyver* in Ergebnisse der Enzymforschung IV, 230, 1935.

(Aus dem botanischen Institut der Universität Würzburg.)

Ein Beitrag zur Morphologie und Physiologie der Zygophoren von Mucor Mucedo*.

Von

Hildegard Kehl.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Juni 1937.)

Über *Mucor Mucedo* gibt es eine umfangreiche Literatur. Der variable Habitus des Pilzes führte zur Beschreibung vieler neuer Arten, die sich später als zugehörig und synonym zu *Mucor Mucedo* erwiesen haben. Schon *Fischer*[1] gibt eine Übersicht aller irrigerweise mit neuen Namen belegten *Mucedo*-Formen.

Bei vielen diözischen Mucorineen vermögen die Sporangienträger zu kopulieren, ohne daß dadurch die Sporulation der kopulierenden Träger eine Beeinträchtigung zu erfahren scheint. In der Kopulationszone bilden die Sporangienträger mehrere, oft sehr zahlreiche Zygoten an beliebigen Kontaktstellen mit einem oder mehreren Sporangienträgern des anderen Geschlechts. „Zygotennester“ dieser Mucorineen weisen dann die typischen Bilder der „Leiterkopulation“ auf. Bei manchen Arten sind die Sprossen einer solchen „Leiter“ von zahlreichen Zygoten gebildet (*Thamnidium*). Die kopulierenden Sporangienträger stellen dabei ihr Wachstum nicht ein und legen an der Spitze meist noch ein normales Sporangium an.

Mucor Mucedo gehört zu den heterothallischen Arten, deren Sporangienträger nicht zu kopulieren vermögen. Die Zygoten werden ausschließlich an besonderen Sexualhyphen, den Zygophoren[2] (*Burgeff*), gebildet. Im Hemmungsraum zweier verschiedengeschlechtlicher *Mucedo*-Mycelien entwickelt sich ein Streifen niedrig bleibenden Geschlechtsmycels, der sich aus den (+)- und (—)-Zygophoren zusammensetzt. Die Zygophoren zeigen zygotropische Krümmungen zueinander. Sie entwickeln eine, selten mehrere Zygoten. Die Zygophoren treffen meist an der Spitze oder etwas darunter aufeinander, was die typischen Bilder der Spitzenkopulation oder Spitzen-Flanken-Kopulation ergibt. Die Zygophoren sind als Geschlechtsorgane zu werten.

---

* Inauguraldissertation der philosophischen Fakultät der Bayr. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

[1] Rabenhorsts Kryptogamen-Flora Deutschlands, 2. Aufl., Leipzig, Kummer, 1892. — [2] Abbildung von Zygophoren, Abb. 2, *a* und 4, *a* S. 389 u. 393.

Außerhalb der Kopulationszone treten im (+)-, seltener im (—)-Mycel häufig den Zygophoren sehr ähnliche Gebilde auf. Ihre Entdeckung ist das Verdienst *Burgeffs*, der sie Spontanzygophoren nannte, weil sie ohne Anwesenheit des anderen Geschlechts außerhalb der Kopulationszone am Mycel spontan gebildet werden.

Fragestellung.

Die Sporangienträger von *Mucor Mucedo* sind lediglich Organe der Sporulation und geschlechtlich nicht induzierbar.

Die Zygophoren sind speziell zur Kopulation bestimmte Organe. Ihre Entstehung ist durch sexuelle Induktion des andersgeschlechtlichen Mycels bedingt. Da sie im Hemmungsraum ohne Kontakt der Substratmycelien gebildet werden, liegt der Auslösung ihrer Entstehung eine Fernwirkung, „Telemorphose“, zugrunde. Die Zygophoren besitzen den für die Sporangienträger so charakteristischen Phototropismus nicht.

Das zygotropische Verhalten zeigt sich am deutlichsten in den Zygophorensternen, in denen viele (—)-Zygophoren eine (+)-Zygophore umstehen und sich alle nach ihr zukrümmen.

Da die Wirkung der Sexualstoffe an besondere Hyphen gebunden ist, dürfte *M. Mucedo* ein sehr geeignetes Objekt sein, die Frage der sexuellen Induktion in Angriff zu nehmen.

Man kann der Frage des physiologischen Chemismus der Sexualität näherkommen, indem man zunächst die Übertragung der in Betracht kommenden Stoffe in den Mittelpunkt der Untersuchungen stellt. Man kann versuchen, Umstimmungen in der Kopulationsmechanik zu erreichen durch Beeinflussung mit geeigneten Stoffen, und man könnte, wäre man nur erst über die Übertragungsmechanik des induzierenden Stoffes im klaren, wohl auch Schlüsse auf die Natur des gesuchten Stoffes selbst ziehen.

Trotz vieler Versuche, ist es ja bis heute noch nicht hinreichend geklärt, ob das Substrat oder die Luft oder beide für die Übertragung verantwortlich zu machen sind.

Den in Frage kommenden Stoff selbst zu finden, ist vielleicht mehr eine Sache des Glücks als eine solche der exakten Forschung.

Mit Rücksicht auf die Wahrscheinlichkeit der Übertragung der Sexualstoffe auch durch die Luft — die Diffusion im Substrat ist nachgewiesen — wählte ich zur Beeinflussung des Mycels vorwiegend ätherische Öle, die neben den darin enthaltenen Terpenen und bekannten chemischen Verbindungen auch noch manche Stoffe enthalten, die bisher noch keiner chemischen Analyse unterlagen.

Kommen also möglichst viele verschiedene ätherische Öle zur Verwendung, die ja nur das Gemeinsame haben, daß sie riechende, flüchtige Substanzen sind, die aber chemisch sehr verschiedene Stoffe enthalten, so besteht die Möglichkeit, auf Stoffe zu treffen, die, den Sexual-

stoffen ähnlich, in den Wirkungsmechanismus der Kopulation einzugreifen vermögen.

Es sei vorausgeschickt, daß es mir mit allen diesen Stoffen nicht glückte, an den geschlechtlichen Hyphen Veränderungen ihres Zygotropismus in absolut eindeutiger und reproduzierbarer Weise zu bekommen.

Jedoch erlaubte mir der Tatbestand, daß die ätherischen Öle die vegetativen und generativen Hyphen des *Mucedo*-Mycels in sehr verschiedener Art beeinflussen, Schlüsse auf die innerphysiologische Verschiedenheit dieser Organe.

Allgemeines zum Problem der sexuellen Induktion.

Die Wissenschaft steht heute auf dem Standpunkt, daß es sich bei Sexualinduktionen um einen innerphysiologischen Chemismus handelt. Die Jagd nach dem „Sexualstoff" der Mucorineen währt schon viele Jahre, ohne daß es bisher gelungen ist, einen wirksamen Stoff zu isolieren und zu analysieren. Mit der Isolierung des wirksamen Stoffes wäre das Mittel gegeben, an rein vegetativen Mycelien diözischer Mucorineen Sexualreaktionen künstlich auszulösen.

Einer Reihe von Forschern, die sich eingehend mit diesem Problem befaßten, gelang es, die Frage um vieles einzuengen, indem sie zunächst die Kopulationsmechanik zum Mittelpunkt ihrer Untersuchung machten.

Blakeslee, der Entdecker der Diözie bei den Mucorineen, stellte fest, daß „the directive influence must lie outside the substratum and in the hyphae affected" (1904, bes. S. 268), was er daraus schloß, daß *Rhizopus*-Mycelien auf frei aufgehängten Substraten in der Luft kopulieren.

Burgeff gelang es, durch seinen bekannten Celloidinmembranversuch dem Problem ein großes Stück näher zu kommen. Er legte mit (+)- und (—)-Mycel bewachsene Agarblöcke aufeinander und brachte zwischen die beiden Mycelien eine Celloidinmembran, die einen direkten Kontakt verhinderte, aber die Möglichkeit einer stofflichen Beeinflussung durch die Membran noch zuließ. Es tritt eine stoffliche Ferninduktion durch die Membran ein, die sich darin äußert, daß die Mycelien sich gegenseitig zur Zygophorenbildung anregen. Dieses Ergebnis spricht für eine Sexualreaktion rein stofflicher Natur. Es muß genau unterschieden werden zwischen den Begriffen Telemorphose und Zygotropismus. Unter Telemorphose sei die Fernanregung zur Bildung von Sexualorganen im weitesten Sinne verstanden, un er Zygotropismus erst das Reagieren der Zygophoren aufeinander. Die Sternfiguren der Zygophoren, die dadurch entstehen, daß sich viele (—)-Zygophoren um eine (+)-Zygophore auf diese sternförmig zukrümmen, sind als typisch zygotropische Reaktionen anzusprechen.

Verkaik (1930) benutzte zwecks Isolierung des wirksamen Prinzips eine Versuchsanordnung ähnlich dem *Burgeff*schen Celloidinmembranverfahren.

Ronsdorf (1931) fand, daß abgetötete Mycelien für das andere Geschlecht unwirksam sind, und daß gewaschene Mycelien einen biologisch unwirksamen Preßsaft liefern.

Schopfer (1928, 1931) behandelt die Frage nach den ernährungsphysiologischen Bedingungen, die für eine Sexualreaktion nötig sind, und fand, daß ein bestimmtes Verhältnis $\frac{\text{Kohlenhydrate}}{\text{Stickstoffverbindungen}}$ und außerdem bei *Phycomyces Blakesleeanus* eine Mindestgabe an Vitaminen nötig ist.

Köhler (1935a und 1935b) widmete der Sexualität von *Mucor Mucedo* eine große Anzahl von Versuchen. Durch fortgesetzte Auslese nach der Stärke der Zygophorenbildung gelang ihm die Züchtung einer Variante von *M. Mucedo*, von ihm „Variante *Laniger*" genannt, die nur noch Spontanzygophoren bildet; diese sollen, sobald sie dem Licht ausgesetzt werden, zur Sporulation umgestimmt werden. Daraus leitet er ab, daß die Spontanzygophoren des (+)-Mycels den sympodial verzweigten (—)-Sporangien homolog seien.

Weiter gelingt es ihm, durch Zugabe geeigneter Adsorbentien zum Nährboden Sexualreaktionen zu unterbinden, woraus er schließt, daß das Substrat *allein* als vermittelndes Medium für die Telemorphose der Sexualstoffe in Frage kommt.

Eine Verstarkung der Zygophorenbildung erzielte er durch regelmäßige Ultraviolettlichtbestrahlungen mit der Quarzlampe und fortgesetzte Kultur im Dunkeln. Für die Umstimmung der sexuell reproduktiven Phase in die asexuelle Phase der Sporulation glaubt er das Tageslicht in hohem Maße verantwortlich machen zu konnen.

Bisher ist es nie gelungen, Sporangienträger der asexuellen Phase in die sexuelle umzustimmen. Die Umstimmung ist nur in der Umkehrung möglich. In Dunkelkulturen durchläuft normalerweise das Mycel zunächst die sexuelle Phase, indem die Zygophorenbildung vor der Sporangienträgerbildung erfolgt.

Von diesen Erfahrungen ausgehend, stellt *Köhler* eine neue Hypothese über das Wesen des induzierenden Stoffes auf, indem er annimmt, daß die asexuell reproduktive Phase aus der sexuellen abgeleitet sei, und daß diese auf Veränderungen im Lichtreizmechanismus der Hyphen beruhe.

Die Versuchsstamme.

Die zu meinen Versuchen verwendeten *Mucedo*-Stämme wurden mir aus der Pilzsammlung des Würzburger Botanischen Instituts überlassen.

Über Morphologie und Habitus meiner Stämme sei folgendes ausgeführt: Die Sporangienträger des (+)-Mycels werden bis 200 mm lang, sind stets unverzweigt und regelmäßig ausgebildet. Die Sporangienträger des (—)-Mycels bilden einen spärlicheren, viel niedrigeren, nur bis etwa 60 mm hohen Rasen. Außerdem hat das (—)-Mycel zahlreiche sympodial verzweigte Zwerg- oder Nebensporangienträger mit kleinen, bläulich-schwarzen, wenig zerfließlichen Sporangien, deren kleinste ohne Kolumella sind. Das (+)-Mycel hat keine Zwergsporangien. Das so zahlreiche Auftreten der Zwergsporangien im (—)-Mycel gibt diesem schon makroskopisch sein charakteristisches Aussehen.

Die Benennung „Zwergsporangien" stammt von *Burgeff* (1924, S. 23). *Köhler* (1935, S. 19) schlägt die Bezeichnung „Nebensporangien" vor. *Zycha* (S. 83) bezeichnet die Zwergsporangienträger als das erste „Stockwerk" des Rasens, das aus stark sympodial verzweigten „Kurztrieben" besteht, und stellt ihnen die Hauptsporangienträger als „Langtriebe" gegenüber.

Die Zygophoren der Kopulationszone werden auf der (—)-Seite in reicherem Maße gebildet als auf der (+)-Seite; sie kommen häufig paarweise

aus dem Substrat. Die (—)-Zygophoren enden etwas feiner und spitzer als die des (+)-Mycels.

Das (+)-Mycel bildet sektorial eine große Anzahl Spontanzygophoren aus, die mit der ersten Sporangienträgerserie auftreten und etwas stärkere Krümmungen aufweisen als die Zygophoren der Kopulationszone.

Das sektoriale Auftreten der Spontanzygophoren ist nach *Köhler* (a) auf eine Heterokaryose des Mycels zurückzuführen.

Das (+)- sowie das (—)-Mycel bilden bei fortschreitender Reife auch ein feinverzweigtes, watteartiges, steriles Luftmycel, das in alten Kulturschalen den Rasen völlig überkleidet und ihm ein typisch watteartiges Aussehen verleiht. Die (+)-Mycelien beginnen mit der Bildung des vegetativen Luftmycels viel später als die (—)-Mycelien, die oft in jungem Zustand schon ein wolliges Aussehen erhalten.

Nährsubstrat.

Als Nährsubstrat diente folgender Malzagarboden: „Diamalt" Malzextrakt (*Merck*) 2,25 g, gewässertes Agar-Agar 1,20 g, Leitungswasser (36 mg Ca O/Liter) 100 g.

Zur Erzielung besserer Zygophorenbildung erhielt der Nährboden in besonderen Fällen einen Zusatz von 0,05 % K_2CO_3 puriss. *Merck*.

Versuche mit ätherischen Ölen.

Methodik.

In 10-cm-*Petri*-Schalen wurden das (+)- und das (—)-Mycel in etwa 4 cm Entfernung nebeneinander (konfrontiert) auf das eben beschriebene Nährsubstrat geimpft. In vielen Versuchen mußten (+)- und (—)-Mycel getrennt kultiviert werden. Oft waren Einsporkulturen erforderlich.

Die Sporen keimen nach 6 bis 8 Stunden, bilden bei optimalen Bedingungen nach 2 Tagen die erste Sporangiontragerserie, während die Substratmycelien in konfrontiert beimpften Schalen noch etwa 2 cm unbewachsenes Agar zwischen sich haben. In diesem Stadium setzte die Beeinflussung der ersten Versuchsserien durch die ätherischen Öle ein. In anderen Versuchsserien wurden die Mycelien unmittelbar vor der Kopulation mit den Ölen versehen.

Die atherischen Öle wurden in einem Tropfen auf ein größeres Glasstück in die Mitte der theoretischen Zygotenlinie der beiden aufeinander zuwachsenden Mycelien gebracht. Pipetten und Tropfstäbe wurden mit Markierungen versehen, zur Entnahme gleicher Ölmengen. Als Ölunterlage erwies sich am praktischsten die Benutzung von Deckgläsern (18 × 18 mm). Man kann darauf einen relativ großen Tropfen (etwa 0,01 g) bringen, ohne daß bei Verwendung einer großen Verdunstungsflache das Öl doch in das Substrat gelangen kann. So bestand für die ersten Stunden der Beobachtung die Gewähr rein atmosphärischer Ölwirkung. Der Öltropfen wurde in gleichen Zeitintervallen erneuert. Nach Stunden und Tagen hat man jedoch keine Garantie mehr für die alleinige Wirkung durch die Luft, da mit dem Eindringen des verdunsteten Öls in das Substrat gerechnet werden muß.

Als praktisch erwies sich ferner die Anbringung des Öltropfens im Schalendeckel als Hängetropfen oder in kleinen offenen Glasbehältern, z. B. in den Nährboden gesteckten Ampullenköpfen.

Um Wirkungen durch den Nährboden zu prüfen, wurden ölgetränkte Zwirnfäden in den *Petri*-Schalenboden unter das feste Agar gebracht, meist in die theoretische Zygotenlinie.

Um Ölbeigaben feiner zu dosieren, kamen feine mit dem entsprechenden Öl gefüllte Glaskapillaren zur Verwendung, die an dem im Nährboden steckenden Ende zugeschmolzen waren, oder auch feinste, mit minimalsten Öltropfen versehene Glasnadeln und Glashaare, die schließlich sogar durch Bambushaare von etwa gleicher Größe wie die Zygophoren ersetzt wurden. Die verfeinerte Versuchsanordnung sollte eine Lokalbeeinflussung auf kleinstem Umkreis bewirken.

Schließlich brachte ich mittels einer feinen Platinnadel Öltropfen direkt an die Hyphen. Um deren Einwirkung auf die Anbringungsstelle zu beschränken, also eine Verdunstung nach außen zu vermeiden, brachte ich das Öl, gebunden an Tierkohle (pulverisiert) oder an Adeps lanae oder an Tierkohle und Adeps, auf die zu beeinflussende Hyphe. Das Öl war vorher im Mörser mit gleichen Teilen Kohlenpulver und Adeps verrieben worden.

Es sei schon im voraus bemerkt, daß die Kapillarversuche nur in wenigen Fällen Reaktionen ergaben, die sich oft widersprachen und deshalb keine eindeutige Deutung erlaubten.

Auch die Versuche mit minimalen Dosierungen, mit Glas- und Bambushaaren und endlich die Anbringung des Öls an der Hyphe selbst führten nicht zu eindeutigen, reproduzierbaren Ergebnissen; sie scheiterten an der Kleinheit der Objekte einerseits, an dem Mangel einer Verdunstungskontrolle der Öle andererseits.

Verzeichnis der angewandten ätherischen Öle.

Angelicaöl (aus Wurzeln, D. A. 6); Anisöl (1a, rekt. weiß, D. A. 5); Baldrianöl (D. A. 6); Bayöl (von *Pimenta acris*); Bergamottöl (1a Reggio); Bittermandelöl (künstl., chlorfr., D. A. 6); Cajeputöl (grün); Calmusöl (D. A. 6); Oleum Camphorae (japonic. nativum); Cassiaöl (chines.); Ceylon-Zimtöl (1a eig. Dest., D. A. 6); Citronellöl (Java, D. A. 6); Citronellöl (Ceylon 1a); Corianderöl; Cypressenöl (Oleum Cupressi fol. ver.); Edeltannennadelöl (von *Abies pectinata*); Fichtennadelöl (extra fein = Edeltannenzapfenöl); Fenchelöl (rekt. D. A. 6); Kümmelöl (1a dopp. rekt., D. A. 6); Latschenkiefernöl (Ol. Pini pumilionis); Lavendelöl (1a franz. Mont Blanc, D. A. 6); Macis- (Muskatnuß-)öl (rekt. weiß, D. A. 5); Messina-Citronenöl (D. A. 6); Nelkenöl (aus Zanzibar-Nelken, D. A. 6); Patchouliöl (aus Blättern); Pfefferminzöl (rekt., D. A. 5); Pomeranzenöl (bitter, 1a Calabr.); Pimentöl; Rosmarinöl (franz. 1a, D. A. 5); Sandelholzöl (ostindisch, D. A. 5); Senföl (künstl. D. A. 6); Sternanisöl (1a chines.); Thymianöl (I, weiß, D. A. 5); Wermutöl (deutsch. extra, eig. Destill.); Wurmsamenöl (Baltimore-Ol. chenopodii).

Chemie der ätherischen Öle.

Bei den meisten ätherischen Ölen bilden Terpene die Grundsubstanz. Medizin, Pharmakologie und Pharmakognosie haben aber vorwiegend Interesse an den Beisubstanzen. Daher sind in der Literatur die ätherischen Öle, die ja nur das Gemeinsame haben, daß sie riechende, mit Wasserdampf flüchtige Substanzen sind, vorwiegend nach der chemischen Natur dieser Beisubstanzen, die ja bisweilen Hauptbestandteil sind, gruppiert.

Sowohl für höhere wie für niedere Pflanzen sind die ätherischen Öle starke Gifte. Die Giftigkeit nimmt zu von den Alkoholen und Estern zu den Terpenen, Ketonen, Aldehyden und Phenolen. Verbindungen mit doppelten Bindungen sind giftiger als die entsprechenden gesättigten.

Wirkung der ätherischen Öle.

1. Wirkungen allgemeiner Natur.

Zunächst seien nur die Verbildungen und Umstimmungen in Wuchs und Habitus ins Auge gefaßt, die von den meisten ätherischen Ölen in gleicher Weise, in stärkerem oder geringerem Grade, bewirkt werden.

Diese Verbildungen tragen später zur Klärung bei und zeigen, wo die Grenzen der rein spezifischen Ölwirkungen zu ziehen sind, und inwieweit diese als Schädigungs-, Hemmungs- oder auch Stimulanz-Erscheinungen oder aber als innerphysiologische Umstimmungen zu deuten sind.

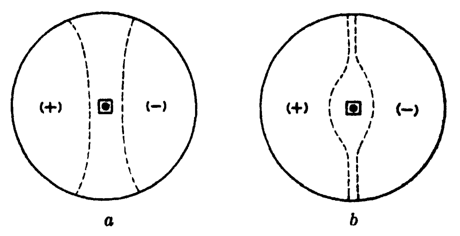


Abb. 1. *Mucor mucedo*. Kulturen in *Petri*-Schale mit konfrontiertem (+)- und (−)-Mycel. In der Mitte das „Ölglas“. Bei *b* Hofbildung (schematisch).

Die Umbildungen lassen sich zwangslos wie folgt einteilen: in Verbildungen am Substratmycel und in Verbildungen am Luftmycel, diese in solche an den Sporangienträgern, Haupt- und Zwergsporangienträgern, an den Zygophoren, Zygophoren der Kopulationszone und Spontanzygophoren, sowie am vegetativen Mycel.

Wie aus dem speziellen Teil der Arbeit hervorgeht, wurden die Mycelien in den verschiedensten Entwicklungsstadien beeinflußt. Um Umstimmungen und „Tropismen“ an den Zygophoren der Kopulationszone zu erhalten, wurden die *Mucedo*-Stämme bis zur Kopulation unter normalen Bedingungen gezuchtet, und erst unmittelbar vor der Zygotenbildung setzte die Beeinflussung ein.

Ganz allgemein zeigten die Zygophoren zweierlei Verhalten: sie gingen bei zu intensiver Ölwirkung zugrunde, oder sie kopulierten sehr verspätet unter Bildung kleiner, spärlicher Zygotennester, deren Zygoten aber meist in der Größe nicht hinter den normalen zurückblieben.

Wird der Tropfen ätherischen Öls auf einem Deckglas in die Mitte der theoretischen Zygotenlinie zwischen die beiden „konfrontiert“ geimpften (+)- und (−)-Mycelien gebracht (siehe Abb. 1, *a*), die eben die erste Sporangienträgerserie zu bilden im Begriff sind, und deren Substratmycelien noch durch etwa 2 bis 3 cm unbewachsenen Nährboden getrennt sind, so ist eine plötzliche Einstellung des Wachstums

am Substratmycel zu beobachten. Nach einigen Stunden schreitet das Wachstum sehr verlangsamt fort. Die jetzt im Nährboden sich vorschiebenden Hyphen sind gedrungen und reicher verzweigt als die normalen, sie haben die Tendenz tiefer in das Agar einzudringen und es dichter zu durchwachsen, was zur Bildung einer ziemlich verfilzten Nährbodenoberfläche führt, die nach Abziehen des gesamten Rasens vom Substrat eine aufgerauhte Agaroberfläche zurückläßt. Schwach wirkende Öle rufen meist noch keine sichtbaren Veränderungen im Substratmycel hervor, wenn sie auch die Lufthyphen schon weitgehend verbilden. Bei stärkerer Ölwirkung lassen die sehr verlangsamt aufeinander zuwachsenden (+)- und (—)-Hyphen um das Ölglas einen breiten Hof unbewachsenen Nährbodens ausgespart (siehe Abb. 1, *b*, S. 385) und treffen sich nur an der Peripherie der Schale, wo sie in einzelnen Fällen noch Zygophoren bilden und kopulieren. Sehr starke Ölwirkungen bewirken um diesen ersten „Hof“, der aus unbewachsenem Agar besteht, einen breiten zweiten „Hof“, der aus den zusammenwachsenden (+)- und (—)-Substratmycelien gebildet wird, die keinerlei Luftmycel mehr haben. In diesem Falle kommt es auch niemals zur Zygophorenbildung bei einem etwaigen Zusammentreffen der beiden Mycelien an der Peripherie der Kulturschale.

Häufig konnten starke Ölablagerungen in den Hyphen beobachtet werden. Kleinere und größere Öltropfen füllten perlschnurartig ganze Hyphen oder lagen zwischen ihnen frei im Nährboden. Beobachtungen über übermäßige Fettablagerungen in Pilzhyphen liegen von verschiedenen Seiten vor. *Zycha* (S. 26) deutet sie als Folge ungünstiger Bedingungen.

Solche Ölablagerungen sowohl wie die Veränderungen im Carotinbestand geben dem Rasen eine Umfärbung, die für die einzelnen ätherischen Öle spezifisch ist, und auf die im speziellen Teil der Arbeit näher eingegangen werden soll.

Die Verbildungen ganz allgemeiner Natur am Luftmycel bewirken, daß das noch junge Mycel in Aussehen und Habitus einem alten gleicht und durch Bildung von Kümmerformen[1] den Eindruck einer Hungerkultur macht.

Die Hauptsporangienträger zeigen die Tendenz niedriger zu bleiben, sich zu verzweigen, legen viele winzige Sporangien an, an so feinen Hyphen, daß sie das Sporangium nicht zu tragen vermögen. Alle soeben angeführten Merkmale betreffen jedoch im Höchstfalle nur ein Drittel der Hauptsporangienträger, deren Mehrzahl nach wie vor normal ausgebildet oder, bei starken Dosierungen, getötet wird. Die Labilität im Wachstum und Habitus kann also bei den Hauptsporangienträgern doch als verhältnismäßig schwach bezeichnet werden.

[1] Ähnlich denen, die durch Dichtsaaten entstehen.

Von allen Organen des Pilzes zeigten sich die Zwergsporangienträger am labilsten in Form, Habitus und Größe, also als diejenigen Organe, die am schnellsten und leichtesten auf Beeinflussungen verschiedenster Natur ansprachen, und aus denen häufig Zwischenformen entstanden, von denen nicht mehr mit Sicherheit ausgesagt werden konnte, ob es sich um einen Haupt- oder Nebensporangienträger handelte.

Ziemlich leicht waren die Spontanzygophoren zu beeinflussen. Sie bildeten eine Art von Zwergsporangienträgern, die jedoch von den echten (—)-Zwergsporangien, auch von den verbildeten, im Habitus meist noch leicht zu unterscheiden waren, zunächst durch ihre Kleinheit, durch die minimale Guttation und dadurch, daß die Sporangien ohne Stielhyphen der Zygophore aufsitzen und nur in seltensten Fällen durch ein nachträgliches interkalares Wachstum eine schwache Verzweigung vortäuschen.

In alten *Mucedo*-Kulturschalen bildet sich regelmäßig ein feines, vielverzweigtes, watteartiges steriles Luftmycel aus, das dem alten Rasen ein verfilztes Aussehen gibt. Dieses sterile Luftmycel ist häufig eine Rasseeigentümlichkeit und auch in der Literatur als solche beschrieben, tritt dann aber schon im jungen Mycel auf. Das (+)-Mycel meiner Versuchsstämme war bei optimalen Kulturbedingungen in jungem Stadium völlig frei von sterilen Lufthyphen, während das (—)-Mycel niemals ohne einen watteartigen Flaum dieser Hyphen war.

Nach meinen Erfahrungen ist eine Vermehrung des sterilen Luftmycels als Indikator für Störungen jedweder Art zu betrachten. Auf alle Veränderungen in den Kulturbedingungen antwortet der Pilz mit einer spontan einsetzenden Bildung dieser „Watte". Ich konnte diese Beobachtung auch an *Phycomyces*[1] und vielen anderen Mucorineen machen. Veränderungen der Luftfeuchtigkeit scheinen ganz besonders wirksam zu sein. Sollte die vermehrte Luftmycelbildung, soweit sie das Maß der Arteigentümlichkeit übersteigt, wirklich ein Indikator für mangelhafte Kulturbedingungen sein, dann liegt der Schluß nahe, daß die optimalen Lebensansprüche meines (+)-Stammes unter denen des (—)-Stammes liegen, und daß das (+)-Mycel das „anspruchslosere" von beiden ist. Es gelang mir jedoch nicht, durch verbesserte Kulturbedingungen einen (—)-Stamm ohne dieses watteartige Mycel zu erhalten.

In den Versuchen machte sich die in der Literatur (*Tschirch*) oft diskutierte „desinfizierende" Wirkung der ätherischen Öle in sehr vorteilhafter Weise bemerkbar. Die Kulturschalen blieben auch bei etwaiger leichtsinniger Handhabung viel länger steril als die Kontrollversuche.

[1] Nach Beigabe eines Tropfens Anisöl bildet *Phycomyces* nach etwa 5 Tagen einen filzigen, wattigen Rasen, dessen habituelles Bild so verändert ist, daß man makroskopisch den Pilz nicht mehr erkennt.

Der Gedanke liegt nahe, den ätherischen Ölen im Pflanzenhaushalt eine desinfizierende, vor Infektion durch Parasiten schützende Rolle zuzuschreiben, jedoch steht dieses Problem hier nicht zur Diskussion.

Endlich möchte ich die starke Steigerung der Guttation durch alle ätherischen Öle erwähnen. Die Guttation ist normalerweise bei *Mucedo* schon groß und habituell sehr charakteristisch. Die Guttationstropfen enthalten Ausscheidungsprodukte. Die mittels feiner Nadeln abgenommenen Tropfen ziehen zentimeterlange Fäden. Nach Beeinflussung durch ätherische Öle wird die Guttation ungeheuer verstärkt, und die Guttationstropfen werden zuweilen zu dicken, zähflüssigen, von der Kugelgestalt abweichenden Gebilden, was auf Ausscheidungen verschiedenster Art schließen läßt.

Von den vielen Verbildungen, die die ätherischen Öle an den Mycelien bewirkten, sind nur die unter gleichen Bedingungen stets reproduzierbaren beschrieben.

Viele interessante Fälle, die zunächst den Anschein erweckten, als bedeuteten sie Umstimmungen von der sexuellen nach der asexuellen Phase, konnten unter gleichen Bedingungen nicht regelmäßig erhalten werden und werden hier deshalb nicht weiter erwähnt.

2. Spezifische Ölwirkungen.

Versuche mit Anisöl, Fenchelol, Sternanisöl.

Sehr gleichmäßig verliefen die Versuche mit Anis-, Fenchel- und Sternanisöl, was zu ihrer gemeinsamen Besprechung berechtigt. Die Umbildungsmerkmale sind bei allen drei Ölen dieselben, nur der Grad der Wirkung ist verschieden. Die intensivste Wirkung kommt dem Anisöl zu, die schwächste dem Sternanisöl, und das Fenchelöl nimmt die Mittelstellung ein.

Die chemische Zusammensetzung der drei Öle ist ähnlich, was die gleichartige Wirkung erklären könnte. Indessen werden die für diese Öle spezifischen Verbildungen auch von einigen anderen, chemisch ganz verschiedenen ätherischen Ölen hervorgerufen, so daß der Schluß auf einen allen gemeinsamen Bestandteil, der die Gleichmäßigkeit der Wirkung verursache, zur Zeit noch keine Stütze findet.

Anisöl enthält 80 bis 90% Anethol, den Methyläther des p-Propenylphenols, sowie das isomere, anisartig riechende, aber nicht süßschmeckende, wie Anethol optisch inaktive Methylchavicol (*Tschirch*, S. 1190).

Fenchelöl enthält als Hauptbestandteil 50 bis 60% Anethol, ferner Methylchavicol und kleine Mengen Anisaldehyd und Anissäure neben verschiedenen Terpenen (*Tschirch*, S. 1202).

Sternanisöl, Oleum Anisi stellati, enthält 85 bis 90% Anethol, etwas d, a-Pinen, Phellandren, Cymol, Methylchavicol usw. (*Tschirch*, S. 1213).

Die Identität des Anethols aus Anis-, Fenchel- und Sternanisöl steht seit *Cahours* (1841) fest.

Setzt man dem Substrat kleine Ölmengen zu, absteigend bis zu geringsten Dosierungen, so keimen die *Mucedo*-Sporen nicht.

Bringt man den Öltropfen auf dem Deckglas in oben beschriebener Weise in die „konfrontiert" beimpfte Kulturschale in dem Stadium, in dem die erste Sporangienträgerserie eben gebildet ist, so sind nach 3 bis 5 Stunden die ersten Verbildungen zu beobachten. Es ist nicht

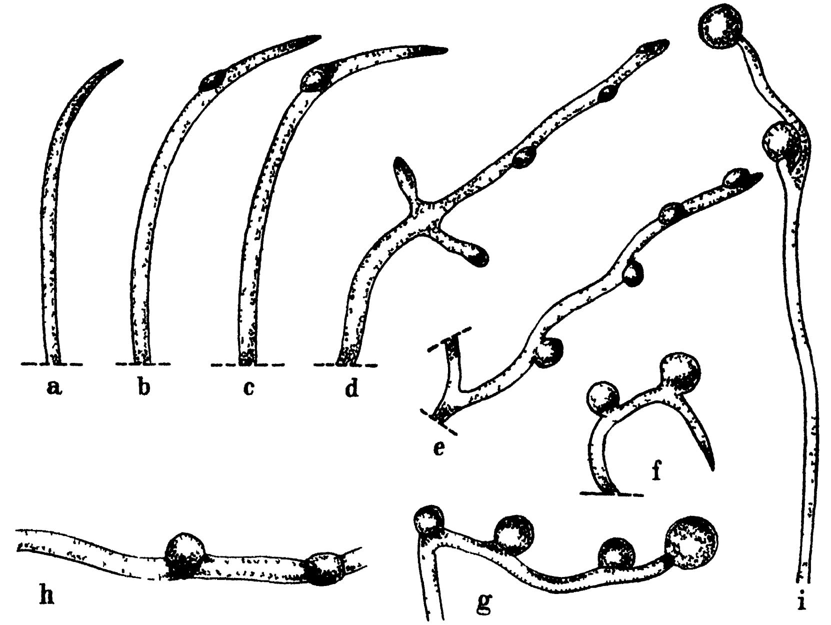


Abb 2. *Mucor mucedo.* *a* normale Zygophore; *b* bis *g* laterale Bildung abnormer Sporangien unter dem Einfluß äther. Öle; *h* anormale Wandbildung; *i* verbildeter Hauptsporangienträger.

anzunehmen, daß der Niederschlag des verdunsteten Öls in dieser kurzen Zeit schon in das Substrat eingedrungen ist und ernährungsphysiologisch wirkt.

Die Sporangienträger schreiten zur Bildung vieler abnormer Sporangien, die, wie aus ihrer Entwicklungsgeschichte ersichtlich ist, nicht endständig an Hyphenverzweigungen, sondern unmittelbar als Aussackungen an den Hyphenflanken gebildet werden (Abb. 2). Sie können nachträglich auf der Hyphe ein wenig gehoben werden und so vortäuschen, an einer Seitenhyphe endständig gebildet worden zu sein. Meistens sitzen sie aber bis zur Reife der Hyphe direkt an.

Die allmählich größer und größer werdenden Aussackungen an der Hyphenflanke erfassen allmählich den ganzen Umfang der Hyphe, werden also nicht durch Querteilung abgetrennt wie bei der Chlamydosporenbildung und bewirken demzufolge ein starkes Abbiegen der

Hyphe, was bei Anlage vieler solcher Sporangien an einer Hyphe zu ganz bizarren Formen führt, die verschiedensten Verzweigungen vortäuscht und den Habitus völlig verändert (Abb. 3d).

Die Hauptsporangienträger sind an diesen Verbildungen nur sehr wenig beteiligt. Sie bilden selten mehr als zwei bis drei dieser abnormen Sporangien aus (Abb. 2, *i*). Daneben entwickeln sie an echten Verzweigungen winzige endständige Sporangien. Die Mehrzahl der Hauptsporangienträger wird jedoch von den Umbildungen gar nicht erfaßt und entwickelt sich normal.

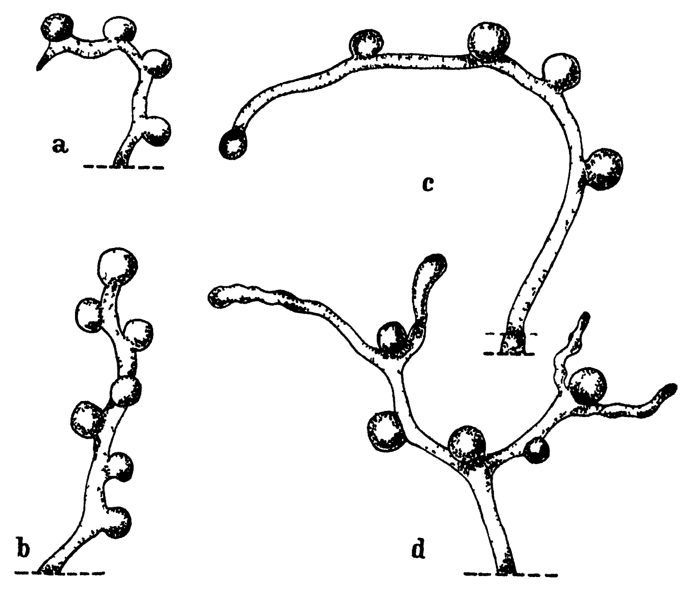


Abb 3. *Mucor mucedo* *a* und *b* abnorme Zygophoren, Sichel- und Zickzackform; *c* und *d* abnorme Zwergsporangien

Die abnorme Sporangienbildung ist am starksten an den Zwergsporangienträgern und *in beinahe demselben Ausmaße an den Spontanzygophoren* zu beobachten. Jedoch sind diese beiden Organe auch in völlig verbildetem Zustande meist noch leicht unterscheidbar. Die Spontanzygophoren legen ihrer Kleinheit entsprechend nur winzige Sporangien an. Die verbildeten Zwergsporangienträger sind größer und weisen neben den oben erwähnten vorgetäuschten meist echte Verzweigungen auf mit endständigen Sporangien.

Unter den vielen bizarren Formen treten am häufigsten und mit großer Regelmäßigkeit zwei Typen auf. Die abnormen Sporangien werden einmal überaus häufig an ein und derselben Hyphenseite angelegt, was viele Abknickungen der Hyphe in ein und derselben Richtung bewirkt und dem Ganzen den Habitus einer „Sichel" verleiht (Abb. 3, *a*).

Diese typischen Sicheln finden sich vorwiegend bei den Spontanzygophoren.

Die zweite Form, die den Sicheln an Häufigkeit nicht nachsteht, entsteht durch regelmäßiges Abwechseln der Sporangienbildung auf beiden Hyphenseiten, was zur Bildung von typischen „Zickzackformen", also „Zickzackzygophoren" oder „Zickzacksporangienträgern" führt (Abb. 3, *b* und 3, *d*). Die letztgenannten sind jedoch weit seltener. Sie können nur aus ganz jungen noch unverzweigten Zwergsporangienträgern entstehen, die älteren schon verzweigten weisen oft Mischformen oder auch Kombinationen dieser Abnormitäten auf.

Wie bereits erwähnt, ließen mich besonders die typischen „Sicheln" Tropismen vermuten, und ich suchte daher sehr genau ihre Richtung zur Ölquelle festzustellen. Wenn ich auch in vielen Fällen ein Wegwachsen zu beobachten glaubte, so standen diesem Befund meist ebenso viele widersprechende gegenüber, und es gelang nicht, Gesetzmäßigkeiten in bezug auf die Richtung der Sicheln festzustellen.

Nach *Zycha* (S. 30) wachsen die Sporangienträger einem mittleren Feuchtigkeitsbereich zu und nicht dem für ihr Längenwachstum optimalen. Sollte das ätherische Öl Feuchtigkeit entziehend wirken, so müßten infolge von Wachstumshemmung auf der dem Ölherd zugekehrten Seite die Sicheln sich vorwiegend nach der Ölquelle zuneigen.

Die von *Elfving* beobachteten positiven Krümmungen bei *Phycomyces*-Sporangienträgern unter Einwirkung von Äther, Nelkenöl, Jod, Salzsäure, Ammoniak und anderen flüchtigen Stoffen, die er als positiven Chemotropismus auslegt, deutet *Zycha* auch als einseitige Wachstumshemmungen der zugekehrten Seite.

Von den abnormen Sporangien gelangen nur wenige zur Reife, meist nur die obersten. Da die Membranen oft eine warzige Oberfläche aufwiesen, lag bei den verbildeten Spontanzygophoren die Vermutung nahe, daß es sich um die Bildung von Sexualorganen, also um eine Art Azygosporen handeln könnte. In 4 %iger Schwefelsäure löste sich jedoch die Membran auf, was darauf schließen läßt, daß es sich um eine Sporangienwand handelt. Einige dieser Sporangien wiesen in ihrer Entstehung große Ähnlichkeit auf mit den von *Burgeff* (1914, S. 41 und 42) beschriebenen Azygosporen bei *Mucor tenuis Bainier*.

Die meisten Sporangien haben keine Kolumella und bilden auch keine Sporen aus. Viele jedoch, vorwiegend die am Ende der Hyphe, weichen in Kolumella und Sporengröße nicht von einem normalen Sporangium ab.

Häufig treten abnorm große Zwergsporangienträger auf, die Zwischenformen darstellen, zwischen Haupt- und Nebenträgern. Diese Zwischenformen sind sehr ähnlich denen, die *Lendner* (S. 67) abbildet als „formes anormales" von *Mucor Mucedo*.

Regenerationen aller verbildeten, auf neuen Nährboden übertragenen Hyphen ergaben ein völlig normales Mycel.

Bei schwacher Öldosierung wuchsen das (+)- und das (—)-Mycel außerhalb des Ölhofs meist doch noch zusammen und bildeten, allerdings selten, sogar Zygophoren, die normal kopulierten.

Mit einer solchen Kopulation hatte ich nicht gerechnet. Denn es gehört zu den spezifischen Wirkungen dieser Öle, *daß sie dem Rasen schon nach kurzer Zeit ein völlig farbloses Aussehen verleihen und alle Farbstoffe zum Verschwinden bringen, damit natürlich auch das Carotin.* Darauf wird weiter unten noch näher einzugehen sein.

Eine für Fenchelkulturen sehr typische Anomalie bestand darin, daß Lufthyphen, scheinbar durch einseitige Wachstumshemmungen, stolonenartig wieder in den Nährboden hineinwuchsen und zu Substratmycel wurden. Jedoch konnte ich auch aus ihrer Lage zum Ölherd keine Gesetzmäßigkeiten ableiten.

Noch eine weitere Anomalie fand sich besonders häufig in Fenchelschalen. Aus vielen Sporangien wuchsen feinste Sekundärsporangien, die alle steril waren. Aus einem Sporangium können sich bis 20 solcher Sekundärsporangien auf feinsten unverzweigten Trägern bilden und schon makroskopisch kenntlich sein. Vielleicht handelt es sich dabei um ähnliche Abweichungen, wie sie *Köhler* (auf S. 9) an einer Variante (*nanus*) seines *Mucedo*-Stammes fand, bei der die Sporen in den Sporangien keimten, und die er mit „Viviparie" bezeichnete.

In alten Kulturschalen bildet häufig auch das sterile Luftmycel viele solcher winziger steriler Köpfchen.

Die Guttation war enorm gesteigert. Erfahrungsgemäß entstehen nach Abnahme einzelner Guttationstropfen die neu sich bildenden genau an gleicher Stelle, was auf besondere Permeabilität der Membran an den guttierenden Stellen schließen läßt und zur Annahme von besonderen Hydathoden (*Lepeschkin*[1]) geführt hat. Einer allgemeinen Guttationssteigerung, wie sie auch unter dem Einfluß von Äther und Chloroform bekannt ist, müßte eine lokal an den Hydathoden erhöhte Wandpermeabilität der Hyphe vorhergehen.

Auch die seitlichen Hyphenaussackungen, die zu den abnormen Sporangien werden, deren Bildung ja eine besonders starke Guttation vorausgeht, können ihre mittelbare Auslösung in einer solchen lokal erhöhten Permeabilität der Wand haben.

Diese Überlegung lag den Versuchen zur Beeinflussung der Hyphen mit Fenchel- und Anisöl zugrunde. Leider führten die Versuche, wie erwähnt, nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen.

[1] *W. Lepeschkin*, Beih. Bot. Zentralbl. **19**, 409, 1906.

Versuche mit Koniferenölen.

Viele ätherische Öle waren wenig charakteristisch in ihren Wirkungen, so daß eine ausführliche Besprechung überflüssig ist. Ungewöhnlich charakteristisch waren die durch Koniferenöle hervorgerufenen Wirkungen, die fast ein Gegenstück zu obigen Versuchen bilden und, wie diese, regelmäßig zu erhalten sind.

Ihrer Chemie nach gehören die Koniferenöle zu den Terpendrogen. Neben den echten Terpentinölen, den Harzterpentinölen, werden die soge-

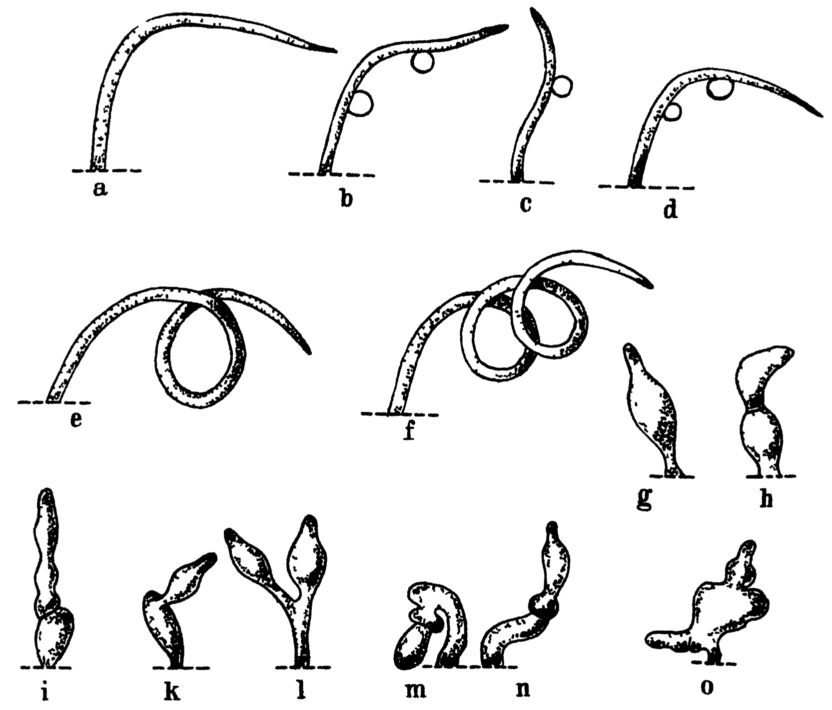


Abb. 4. *Mucor mucedo.* *a* normale Spontanzygophore (+); *b, c, d* unter dem Einfluß von Äther guttierend, *e, f* unter dem Einfluß von Fichtennadelöl Schleifen bildend, *g* bis *o* Verbildungen unter dem Einfluß eines Luftstromes.

nannten Nadelterpentinöle (Fichtennadelöle) durch Destillation der Nadeln, sowie junger Zweige und Zapfen einiger Koniferen dargestellt (*Tschirch*, S. 887).

Die Sporangienträger zeigten unter dem Einfluß der Koniferenöle eine von farblosen Stücken unterbrochene Gelbfärbung, ähnlich wie das Substratmycel, so daß der Rasen bei beiden Geschlechtern schon nach 5 bis 6 Stunden *eine weit über die normale Farbe hinausgehende Gelbfärbung aufwies.*

Die Bildung des sterilen Luftmycels blieb gering. Das Bodenmycel wuchs normal bis an den Ölherd heran ohne Hofbildung. Die Kopulation

setzte etwas verspätet ein und nicht mit der zu erwartenden Regelmäßigkeit. Sie blieb mitunter in allen Versuchen aus oder war in der nächsten Kulturserie in jeder zweiten Schale zu beobachten. Die (+)-Suspensoren behielten ihren typischen scharf umgrenzten gelben Ring, und die Zygoten waren normal.

Von den Zwergsporangienträgern werden wenige verbildet und nicht über das Maß der allgemeinen Schädigungsmerkmale hinaus.

Die Spontanzygophorenbildung war sehr gesteigert. Besonders beim Fichtennadelöl (= Tannenzapfenöl) zeigten die Spontanzygophoren *Krümmungen und Windungen,* die ich in Kontrollschalen nie gefunden habe. Normalerweise sind die Spontanzygophoren etwas stärker gekrümmt und nach dem Boden geneigt als die Zygophoren der Kopulationszone, in seltenen Fällen bilden sie sogar eine mehrfache Schleife (Abb. 4, *e*, *f*).

In Fichtennadelölkulturen konnte ich dicht nebeneinander viele Spontanzygophoren finden, die zwei und drei Schleifen umschrieben und demzufolge bedeutend länger waren als die normalen Spontanzygophoren. Am schönsten fanden sich die „Doppelschleifen" an der Peripherie der Kulturschale. Bei minimalen Dosierungen blieben sie aus, bei stärkerer Ölbeigabe wurden sie nicht stärker verändert. Der Pilz wird durch Koniferenöle augenscheinlich sehr wenig geschädigt.

Alle meine Versuche, durch abgestufte Dosierung, etwa in konzentrischen Kreisen, Zonen verschiedener Schädigungsgrade zu erhalten, gingen fehl. Sie gelangen nur mit den Ölen, die auch in kleinsten Mengen tödlich wirken; hier schreitet dann das Absterben des Mycels in konzentrischen Zonen nach der Peripherie der Schale fort (z. B. beim Senföl).

Die stark vermehrte Spontanzygophorenbildung blieb jedoch in Edeltannennadel- und Terpentinölkulturen häufig aus, in Fichtennadelölkulturen trat sie ziemlich regelmäßig auf. Da bei diesem Öl auch die Kopulation über das Normale hinausging, bin ich geneigt, eine die sexuelle Aktivität stimulierende Wirkung des Fichtennadelöls anzunehmen. Darauf wird im Kapitel *Aktivität und Carotingehalt* noch einzugehen sein.

Spezifische Wirkung anderer ätherischer Öle.

Es seien noch einige charakteristische Wirkungen anderer ätherischer Öle erwähnt:

Thymianöl und Senföl bewirkten, auch bei schwacher Dosierung, ein zonal fortschreitendes Absterben des Mycels. Wurden Pilzrasenstücke einer in dieser Weise geschädigten Kultur nach 8 bis 12 Stunden auf neue Nährböden übertragen, so vermochten sie nicht weiterzuwachsen.

Dem Thymianöl war neben Thymol (krist.), Menthol, Vanillin und Anisöl die stärkste desinfizierende Wirkung zuzuerkennen. Alte, offen in den Arbeitsraum gestellte Kulturschalen blieben zuweilen mehrere Tage ohne den kleinsten Infektionsherd.

Mit Mentholbeigaben erhielt ich fast dieselben Wirkungen wie bei den Anetholölen (Anis usw.). Es traten Rasenverfärbungen sowie die typischen „Sicheln" und Zickzackzygophoren auf. Eine allerdings nur schwache Annäherung an die Wirkungen der Anetholöle zeigten die Baldrianölkulturen. Jedoch blieb hier die Verfärbung des Rasens aus.

Bei Versuchen mit Sandelholzöl waren besonders schöne „Sichelformen" verbildeter Spontanzygophoren zu beobachten, die aber nicht regelmäßig auftraten.

Vanillin bewirkte starke Mycelentfarbungen. Die Zitronellöle und das Pomeranzenöl, sehr ähnlich in ihrer Wirkung, zeichneten sich durch besonders starke Bildung sterilen Luftmycels aus. Dies führte zur Bildung von „Tagesringen", ergab also Zonen mit habituell völlig verschiedenem Luftmycel. Die Sporangienbildung ging also auf ein Minimum zurück. Jedoch trat die Verlangsamung des Mycelwachstums, die nach Beigabe aller Öle starker oder schwacher einsetzt, bei den Zitronellölen nur sehr schwach in Erscheinung.

Wirkungen anderer flüchtiger Stoffe.

Bei Versuchen mit Pflanzenteilen (Samen, Drogen, die reich an ätherischen Ölen sind[1]) traten selten Reaktionen des Mycels ein, im Höchstfalle Erscheinungen, die den durch schwache ätherische Öle hervorgerufenen gleichkamen.

Auf Narkotica reagierte das Mycel nicht gleichmäßig.

Mit Ätherbeigaben konnte ich die Guttation zu einem die Wirkung aller ätherischen Öle überragenden Maße steigern. Sogar die Spontanzygophoren zeigten regelmäßig eine so erhebliche Guttation, wie ich sie sonst nie beobachten konnte (Abb. 4, *b*, *c*, *d*, S. 393). Mit Chloroform gelang dies nie.

Deutung dieser Wirkungen.

In allen Versuchen waren die Zygophoren der Kopulationszone die einzigen Organe des Pilzes, die niemals von Umbildungen erfaßt wurden. Schädigungen erlagen sie nur insofern, als die Kopulation mehr oder weniger herabgesetzt wurde oder die vor der Ölbeigabe gebildeten Zygophoren zugrunde gingen, ohne zu kopulieren.

[1] Labiaten, Geraniaceen usw. — Geranioldrogen, Cineoldrogen usw. — *Teucrium Marum*, *Pelargonium*. — *Salvia officinalis*. — Rhizoma Hydrastis.

Durch Beigaben des ätherischen Öls im jüngeren Stadium der Kultur kann die Bildung der Zygophoren vermindert oder ganz verhindert werden.

Dagegen konnte die Sporulation als solche in keinem Falle unterdrückt werden, wie weitgehend auch die Organe der Sporulation morphologisch verbildet waren.

Der Vorgang der Sporulation liegt in der „*vegetativen Phase*" der Pflanze und braucht als solcher nicht die Voraussetzungen, die die Bildung der Zygophoren an den innerphysiologischen Chemismus des Pilzes stellt.

Sind jedoch die Voraussetzungen zur Zygophorenbildung gegeben, dann ist die physiologische Differenzierung der Zygophoren bei *Mucor Mucedo* eine absolute. Die einmal erfolgte Induktion ist nicht rückgängig zu machen. An der Kopulation gehindert, gehen die Zygophoren zugrunde.

Es war nun zu erwarten, daß das Verhalten der Spontanzygophoren denen der echten Zygophoren ähnlich ist. Die Spontanzygophoren, obwohl sie ohne Anwesenheit des anderen Geschlechts entstehen, lassen ihrem Habitus zufolge keinen Zweifel über ihre Zygophorennatur zu. Die Tatsache, daß vermehrte Spontanzygophorenbildung ein Faktor ist, der zwei anderen Faktoren: Carotingehalt und Aktivität, stets parallel geht, spricht auch dafür, daß es sich bei ihnen um sexuelle Organe handelt.

Man könnte sich vorstellen, daß sie durch eine „Autoinduktion" eines im (+)-Mycel vorhandenen Sexualstoffes „*a*" und im (–)-Mycel[1] durch eine solche eines Sexualstoffes „*b*" ausgelöst werden, und daß zu dieser Autoinduktion nur hoch aktive Stämme befähigt sind, während die Zygophoren der Kopulationszone durch Zusammenwirken dieser beiden Stoffe $a + b = c$ gebildet werden, also einen dritten Stoff „*c*" enthalten.

Köhler faßt die Spontanzygophoren und die (–)-Zwergsporangien als homologe Organe auf. Sind diese Homologieschlüsse richtig, dann taucht die Frage auf, ob die Zwergsporangien zur Sporulation umgestimmte Spontanzygophoren sind, oder aber ob die Umkehrung vorliegt, daß die Spontanzygophoren eine Ableitung der Zwergsporangienträger darstellen.

Wäre meine Ansicht richtig, daß das Optimum der Kulturbedingungen beim (–)-Mycel über dem des (+)-Mycels liegt („Wattebildung"), und könnte man sich die Erzielung der Spontanzygophoren im (—)-Mycel vermittels Ultraviolettbestrahlung durch eine Ver-

[1] Es ist gelungen, auch das (—)-Mycel zur Spontanzygophorenbildung zu bringen (*Köhler*).

besserung der Lebensbedingungen des (—)-Stammes erklären, dann würde dies zur Auffassung der Zwergsporangien als infolge mangelhafter Lebensbedingungen „degenerierter" Spontanzygophoren berechtigen.

Aktivität und Carotingehalt.

Das (+)-Mycel meiner Stämme zeichnete sich durch besonders hohen Carotingehalt aus. Das Substratmycel wies unter normalen Bedingungen eine Gelbfärbung auf, die das (—)-Mycel auch nicht annähernd erreichte.

Viele Forscher vermuten zwischen Carotingehalt und Sexualität des Pilzes einen engen Zusammenhang, sie wollen geradezu einen Gradmesser für die Höhe der Aktivität im jeweiligen Carotingehalt des Mycels erblicken. [*Chodat* und *Schopfer*, S. 178, *Köhler* (a)].

Die Verschiedenheit der beiden Mycelien im Carotingehalt wird in der Literatur häufig diskutiert und sogar als sekundäres Geschlechtsmerkmal angesehen. Da einer Farbstoffanhäufung auch eine größere Nährstoffspeicherung parallel geht, glauben sich viele Forscher berechtigt, das (+)-Mycel als das weibliche zu betrachten und das (—)-Mycel als das männliche. *Köhler* sieht in der Carotinbildung eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Aktivität des Mycels. Er konnte beobachten, daß einer vermehrten Zygophorenbildung stets eine Steigerung des Carotingehalts folgte. Ebenso fand sich die Anreicherung der gelben Mycelfarbe in Dunkelkulturen und nach Ultraviolettbestrahlungen. An einem mit Ultraviolettlicht bestrahlten (—)-Stamm erzielte er neben Spontanzygophorenbildung auch denselben Gehaltsgrad an Carotin, wie ihn die (+)-Mycelien aufweisen.

Da sich in meinen Versuchen mit Anetholölen sowie einigen anderen ätherischen Ölen die Entfärbung des Mycels als wichtiges Charakteristikum erwies, hatte ich bei diesen Versuchen mit einem regelmäßigen Ausbleiben der Kopulation gerechnet.

In Anisölversuchen kam es allerdings äußerst selten zu einer Kopulation, in den Fenchel- und Sternanisölversuchen jedoch in jeder sechsten bis achten Kulturschale. Ist Carotingehalt eine der zur Kopulation nötigen Voraussetzung, dann hätte die Kopulation völlig unterbleiben müssen. Um diesen Widerspruch aufzuhellen, machte ich folgende Versuche.

Ich nahm Mycelausschnitte des blassen Rasens aus Kulturschalen verschiedenster Beeinflussungsdauer von Anetholölen und „konfrontierte" je einen (+)- und (—)-Ausschnitt auf neuem Nährboden unter normalen Bedingungen.

Ich konnte feststellen, daß das neu gebildete Mycel nach Aufgabe aller sonstigen Verbildungen die blasse Färbung noch lange beibehielt. Erst nach wiederholter Übertragung zeigt das Mycel seine normale

Die „konfrontierten“ Mycelien wuchsen normal weiter, bis nach 5 bis 6 Stunden die Lufthyphen der vordersten Wachstumszonen Verbildungen erlitten, wie sie aus der Zeichnung ersichtlich sind. Die Lufthyphen der vordersten Zonen bekommen die Neigung, kurz zu bleiben und, korrelativ dazu, ungewöhnlich dicke bauchige Anschwellungen zu entwickeln, die zu ganz bizarren Formen führen (Abb. 4, *g* bis *o*, S. 393). Die in der Zygotenlinie auftretenden Zygophoren erreichen nicht die normale Lange, kopulieren jedoch in den meisten Fällen nach einer Verzögerung von 10 bis 12 Stunden normal.

Es wurde eine Reihe anderer Versuchsanordnungen zur Ergänzung dieses Versuchs hergestellt, die dieselben Zwecke verfolgten und ähnliche Wirkungen auf die Kulturen haben mußten.

Eigens zu diesem Zwecke hergestellte Kulturkammern wurden an eine Saugpumpe angeschlossen, die einen stets gleichgerichteten kontinuierlichen Luftstrom über die Kulturen saugte. Die Kulturkammern waren flache, ovale geschlossene Glaskammern mit je zwei angeschmolzenen Glasrohransatzstucken zum Zu- und Ableiten der Luft.

Wenngleich das Beimpfen dieser Kulturkammern recht erschwert war, weil die Kammer allseitig geschlossen ist, so garantierten sie doch viel einheitlichere Durchluftungsbedingungen als obiger Versuch.

Die Beimpfung der Kammer geschah auf dreierlei Art.

Zunächst wurden die Mycelien so nebeneinander geimpft, daß ihre Zygotenlinie parallel zum Luftstrom zu liegen kam.

Dann wurden die Mycelien hintereinander geimpft, in der Weise, daß die Zygotenlinie quer zur Luftstromung gebildet wurde, und daß diese die beiden Mycelien nacheinander überstrich, entweder in der Richtung vom (+)- zum (—)-Mycel oder umgekehrt in der Richtung vom (—)- zum (+)-Mycel.

Die Luftstromung war hier wie auch in oben beschriebenem Versuch verhaltnismäßig sehr schwach, mit der Hand noch eben spurbar und betrug bei dem Ventilatorversuch

$$\frac{19{,}4}{60}\ \mathrm{m/sec} = 0{,}323\ \mathrm{m/sec}.$$

Dieser Wert laßt sich leicht mit einem Windmesser ermitteln.

Bei dem Saugversuch wurde die Kultur in 90 Sekunden von einem Liter Luft überstrichen. Dies laßt sich leicht dadurch feststellen, daß man mit einem geeichten Kolben die passierende Luft unter Wasser auffängt und die Dauer des Vorgangs mit einer Stoppuhr bestimmt. Die oben genannten 90 Sekunden stellen den Mittelwert vieler solcher Messungen dar.

Die Ergebnisse des Saugversuchs waren denen des Ventilatorversuchs sehr ähnlich.

Das Mycel wuchs normal weiter unter Bildung einiger knolliger „Kurzhyphen“. Die Kopulation wurde etwas verzögert (etwa 10 bis 12 Stunden), war aber durch den Luftstrom nicht aufzuheben.

Schwache Luftströme vermögen also die sexuelle Induktion nicht zu unterbinden, entweder weil ihre Wirkung zu gering ist, oder weil die Induktion nur im Substrat stattfindet, oder aber sowohl in der Luft als

im Substrat, wobei die Induktion durch das eine der beiden Medien die durch das andere vollkommen zu ersetzen vermag.

Von dieser Theorie ausgehend, würde im *Rhizopus*-Versuch von *Blakeslee* die „Luftinduktion" allein vollkommen zur Kopulation ausreichend sein, in Windversuchen dagegen die Substratinduktion.

Ein weiterer recht einfacher Versuch führte zu einer Einengung der Frage.



Abb. 5. Normale Kopulation. Zygophoren krümmen sich nach der Kopulationszone hin.

Um stärkere Luftströme wirken zu lassen, wurden die Mycelien in offenen *Petri*-Schalen dem Wind des Ventilators direkt ausgesetzt in der Weise, daß vier bis sechs *Petri*-Schalen etwas schräg zur Windrichtung, etwa auf eine gegen den Ventilator schräg gestellte Ebene gesetzt wurden und tagelang in diesem starken Luftstrom blieben. Um ein Austrocknen des Nahrbodens zu vermeiden, was einem frühzeitigen Abbrechen des Versuchs gleichkommen würde, wurde die Versuchsanordnung ins Gewächshaus verlegt, wo konstante Temperatur (Tag und Nacht!) und ein Wasserzerstäuber für gleichmäßige Temperatur und Luftfeuchtigkeit sorgen konnten. Daß die Kulturen, da sie offen standen, nicht steril blieben, fiel für die Versuche nicht störend ins Gewicht.

Der Nährboden wurde zur Erhöhung der Zygotenbildung besonders dick ausgegossen (1 cm) und erhielt einen Zusatz von 0,05 % K_2CO_3.

Der Ventilator erhielt den elektrischen Anschluß von 110 Volt, und die Windgeschwindigkeit betrug 1,45 m/sec.

Die Wirkung war in allen Kulturserien dieselbe und stets reproduzierbar, das Ergebnis stets klar und eindeutig.

Die Kopulation tritt mit Regelmäßigkeit ein und ist also auch durch einen starken Windstrom nicht aufzuheben. Wohl wird auch hier die Kopulation etwas verzögert wie in den obigen Versuchen.

Die gedrungenen „Kurzhyphen“ treten in beiden Geschlechtern auf.

Die Zygotenlinie bleibt immer auffallend schmal.

Die Zygophoren bleiben kurz und sind gedrungener als normal. Sie zeigen keinerlei zygotropische Krümmungen zueinander (Abb. 5, 6, 7).



Abb. 6. Normale Kopulationszone. Kopulation zygotropisch reagierender Zygophoren Sternbildung (+)-Zygophoren wachsen von allen Seiten nach dem (−)-Suspensor hin.

Verfolgt man ihre Entwicklung, so zeigt sich, daß sehr wenige kurz bleibende, gedrungene Zygophoren in der Kopulationszone gebildet werden, die entweder aufrecht oder, seltener, nach beliebigen Richtungen stehen, also keinen Zygotropismus mehr erkennen lassen.

Die wenigen regelmäßig gebildeten Zygoten entstehen anscheinend durch Thigmomorphose, also durch zufälligen Kontakt der Zygophoren.

Eine normale Zygotenlinie kann man zwanglos in drei ziemlich scharf voneinander getrennte Zonen einteilen: in der Mitte die mehr oder minder reifen Zygoten, nach außen je ein Streifen stark zygotropisch gekrümmter (+)- und (—)-Zygophoren, die möglicherweise noch zur Kopulation gelangen, und noch weiter außen ein Streifen aufrechtstehender Zygophoren, die anscheinend auf Grund von Telemorphose gebildet werden, aber außerhalb der „*zygotropischen Kraftfelder*“ stehen und somit von der Kopulation ausgeschlossen bleiben. Die Zygoten-

linien in den Versuchskulturen weisen von den drei Zonen nur die mittelste auf, die beiden zygotropisch reagierenden fallen weg.

Es ist also sicher eine starke Verminderung des Zygotropismus eingetreten.

Sollten die Zygoten nicht allein durch Thigmomorphose gebildet werden, sondern zwischen den kurzen kopulierenden Zygophoren doch noch der Zygotropismus wirken, so kann man doch jedenfalls die Behauptung aufstellen, daß das „Kraftfeld“ des Zygotropismus weitgehend verkleinert ist.

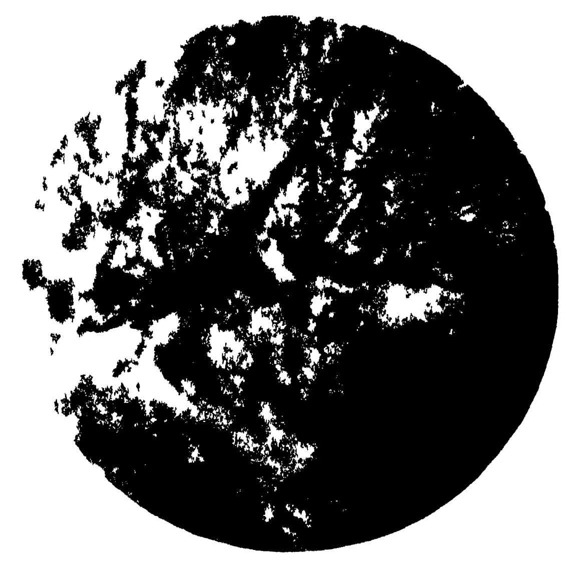


Abb. 7. Kopulation im Windstrom ohne zygotropische Erscheinungen.

Schlußbetrachtung.

Mucor Mucedo zeigt eine große Resistenz schadigenden Einflussen gegenuber. Das Mycel vermag in Dampfen vieler bakterizid wirkender atherischer Öle weiterzuwachsen.

Der Vorgang der Kopulation ist leichter aufzuheben als die Sporulation. Die Organe der Sporulation unterliegen zwar weitgehend Verbildungen, werden aber stets ausgebildet, sofern die Grenze der Lebensbedingungen nicht unterschritten ist. Die Ausbildung der Kopulationsorgane ist leichter zu unterbinden. Diese Organe stellen an den physiologischen Chemismus des Pilzes höhere Anspruche als die Organe der Sporulation.

Die (+)-Spontanzygophoren verhalten sich den (—)-Zwergsporangien so ahnlich, daß eine Homologie dieser beiden Organe angenommen werden kann.

In bezug auf den Carotingehalt führten die Versuche zu großen Widersprüchen.

Die Ergebnisse der Versuche mit Koniferenölen stehen in Einklang mit den bisherigen Erfahrungen über die Bedeutung des Carotingehalts und könnten einen neuen Beweis für die Zusammengehörigkeit der beiden inneren Faktoren: Carotingehalt und Aktivität, liefern. Die Anetholölversuche widersprechen dem aber und berechtigen daher zum Zweifel, ob im Carotingehalt wirklich eine für die Kopulation wichtige Voraussetzung erblickt werden darf.

Es wäre die Aufgabe chemischer Untersuchungen, nachzuweisen, wieweit in einem völlig entfärbten „Anetholrasen" das Carotin durch die Gifte zerstört ist.

Auf Störungen jedweder Art reagiert das Mycel mit Bildung eines sterilen, watteartigen Luftmycels, was in dem normalerweise homogenen Rasen zur Bildung von „Tagesringen" führt.

Unter normalen Bedingungen besitzt eine *Mucedo*-Kultur kein steriles Luftmycel, erst in sehr alten Kulturen tritt es auf, wohl infolge der Verarmung des Nährbodens.

Es war ein Charakteristikum meines (—)-Versuchsstammes, daß er schon in jungem Stadium nie ohne einen feinen Flaum dieses watteartigen Mycels war, was in der Literatur haufig als „Rasseeigentümlichkeit" gewertet wird. Ich habe in meiner Arbeit eine andere Deutung dafür gegeben, nach der das Optimum der Lebensbedingungen bei dem (—)-Mycel über dem des (+)-Mycels liegt. Diese Deutung wird Stützpunkt für eine weitere Hypothese, die die (—)-Zwergsporangien als „degenerierte" Spontanzygophoren auffaßt.

Die Bestrahlung mit Ultraviolettlicht, durch die ein (—)-Stamm ja auch zur Bildung von Spontanzygophoren angeregt werden kann (*Köhler*), ist zwanglos als ein Heben der Lebensbedingungen anzusehen, wofür auch die nach erfolgter Bestrahlung erhöhte Aktivitat sprechen dürfte.

Es müßte geprüft werden, ob dieses mit (—)-Spontanzygophoren begabte Mycel rein weiter zu züchten ist, ob auch durch andere Methoden, wie durch Bestrahlung mit Ultraviolettlicht, aus einem (—)-Mycel mit Zwergsporangien ein solches mit (—)-Spontanzygophoren erzogen werden kann durch rein äußeres Verbessern der Kulturbedingungen oder durch Auslese, die in Richtung nach der spärlichsten Zwergsporangienbildung zu erfolgen hätte.

Die Versuche mit kontinuierlichem Luftstrom beweisen, daß die Luft das Medium für den Zygotropismus ist. In genügend starkem Strom unterbleibt die zygotropische Anziehung der Randzygophoren. Absolute Aufhebung des Zygotropismus zwischen den Zygophoren der innersten Zone konnte allerdings nicht bewiesen werden.

Die Beobachtung, daß „konfrontierte“ Mycelien, die durch Ausschnitt eines Agarstreifens zwischen ihnen an der Kopulation lange Zeit gehindert waren, auf neuem Substrat verstärkte Aktivität zeigen, weist auf die Wirkung einer lange andauernden Luftinduktion hin, die vor der Übertragung des Mycels wirkt.

Diese Beobachtung könnte zum Ausgangspunkt für weitere Versuche werden, die über die Art der Induktion durch die Luft Aufschluß geben könnten.

Zusammenfassung.

1. Die Zygophoren der Kopulationszone bei *Mucor Mucedo* waren niemals von der sexuellen in die asexuelle Phase umzustimmen.

2. Die Spontanzygophoren waren dagegen sehr leicht zur Sporulation umzustimmen und verhielten sich dann den Zwergsporangien so ähnlich, daß auf eine Homologie der beiden Organe zu schließen ist.

3. Spontanzygophoren sind ihrem innerphysiologischen Verhalten nach den Zygophoren der Kopulationszone nicht gleichwertig.

4. Schädigungen gegenüber sind von allen Organen von *Mucor Mucedo* die Zygophoren der Kopulationszone am resistentesten.

5. Beeinflussung mit flüchtigen Stoffen bewirkt die Tendenz vermehrter Sporangienbildung, ohne die Kopulation absolut aufzuheben.

6. Die Anetholöle bringen das Carotin des Pilzes zum Verschwinden, ohne die Kopulation aufzuheben, was zum Zweifel an einem physiologischen Zusammenhang zwischen Aktivität und Carotingehalt berechtigt.

7. Fichtennadelöl erhöht den Carotingehalt, steigert die Bildung von Spontanzygophoren und erweitert deren Entwicklung.

8. Mycelausschnitte geschädigter und an der Kopulation gehinderter *Mucedo*-Kulturen neigen bei Verpflanzung zu verstärkter Aktivität.

9. Ein konstanter Luftstrom vermag die Kopulation nicht aufzuheben.

10. Die zygotropische Reaktion ist durch einen kontinuierlich gleichgerichteten Luftstrom aufzuheben oder doch auf ein Minimum herabzusetzen.

Literatur.

Blakeslee, A. F., Science (N. J.) **19**, 864, 1904 (a); Proc. amer. Sci. **40**, 205, 1904 (b); Annales Mycol. **4**, 1, 1906; Science (N. J.) **27**, 880, 1913. — *Blakeslee, A. F.*, u. *I. L. Cartledge*, Bot. Gaz. **84**, 51, 1927 (Ref.: Bot. Zentralblatt **12**, 159). — *Brefeld, O.*, Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. I. Leipzig, Arthur Felix, 1872. — *Busgen, M.*, Jahrb. f. wiss. Bot. **13**, 253, 1882. — *Burgeff, H.*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **30**, 679, 1912; Flora **107**, 255, 1915; **108**, 353, 1915; Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **38**, 318, 1920; Zeitschr. f. Bot. **12**, 1—35, 1920; Bot. Abh. **4**, 4, 1924; *Burgeff, H.*, u. *A. Seybold*, Zeitschr. f. Bot. **19**, 497, 1927.

Chodat, R., u. *W. H. Schopfer*, C. r. Soc. Phys. et Hist. Natur. Genève **44**, 176, 1927 (Ref.: Bot. Zentralbl. **12**, 284, 1928).

Elfving, F., Eine im Bot. Institut Würzburg vorh. Übersetzung aus Öfvers. Finsk. Vet. Soc. Förh. **59**, 1917.

Graser, M., Beih. z. Bot. Zentralbl. **1**, 414, 1919.

Hagem, O., Annales Mycol. 8, 265, 1910. — *Henckel, A.*, Bull. Inst. rech. biol. et Stat. Biol. a. Univ. Perm. **5**, 307, 1927 (Ref.: Bot. Zentralbl. **12**, 418, 1928).

Joyet-Lavergne, Ph., Protoplasma **11**, 321, 1930 (Ref.: Bot. Zentralbl. **18**, 404, 1931).

Klebs, G., Die Bedingungen der Fortpflanzung einiger Algen und Pilze. Jena 1896; Jahrb. f. wiss. Bot. **32**, 1, 1898. — *Kniep, H.*, Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena, Gustav Fischer, 1928. — *Köhler, F.*, Zeitschr. indukt. Abst. u. Vererbungsl. **70**, Heft 1 (Dissertation), 1935 (a); Planta **23**, 358, 1935 (b). *Korpatschewska, I.*, Bull. Soc. bot. Genève 2. Série, **1**, 317, 1909.

Lendner, A., Les Mucorinées de la Suisse. Bern 1908. — *Lindner, P.*, u. *Glaubitz*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **31**, 316, 1913.

Molisch, H., ebenda **14**, 18, 1896.

Orban, G., Beih. z. Bot. Zentralbl. **36**, 1, 1919.

Ritter, G. E., Jahrb. f. wiss. Bot. **52**, 351, 1913. — *Ronsdorf, L.*, Planta (Berl.) **14**, 482, 1931.

Satina, S., u. *A. F. Blakeslee*, Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **11**, 528, 1925; **14**, Nr. 3, 1928. - *Satina, S.*, ebenda **14**, 308, 1928 (Ref.: Bot. Zentralbl. **13**, 208, 1928); Bot. Gaz. **90**, 299, 1930 (Ref.: Bot. Zentralbl. **19**, 32, 1931). — *Schmidt, R.*, Jahrb. f. wiss. Bot. **64**, 509, 1925. — *Schopfer, W. H.*, Recherches sur la sexualité des champignons. Thèse de Genf 1928; C. r. Soc. Physiol. Hist. nat. Genève **44**, 1927 (Ref.: Bot. Zentralbl. **12**, 37, 1928); Bull. Soc. Bot. Suisse **40**, 87, 1931; **41**, 73, 1932.

Tschirch, A., Handb. d. Pharmakognosie **2**, 2, 1917.

Verkaik, C., Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. **33**, Nr. 6, 1930.

Wesendonk, I., Dissertation Wurzburg 1930.

Zettnow, E., Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **31**, 362, 1913. — *Zycha, H.*, Mucorineae. Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, **6a**, Pilze II, Berlin, Gebrüder Borntrager, 1935.

Ein neuer Impfschrank[1].

Von

Georg Schweizer, Hohenheim (Wttbg.).

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 19. August 1937.)

Sogenannte Impfkästen oder Impfschränke — in manchen größeren und in Spezial-Instituten selbst ganze Impfzimmer — sind schon seit Jahren für gewisse mikrobiologische Arbeiten zwecks Verhinderung der Luftinfektion in Gebrauch. Bei Einführung der Impfkästen war das leitende Prinzip (1) die allgemein bekannte Methode, Umimpfungen und Umbettungen eines Objekts, z. B. von einem Kulturgefäß in ein anderes, in einer Wasserdampfatmosphäre — im einfachsten Falle über einem Topf kochenden Wassers — vorzunehmen.

Dabei wird von einem außerhalb des Impfkastens befindlichen Dampferzeuger aus durch eine Röhre heißer Wasserdampf in den Impfschrank eingeleitet, um fremde Keime innerhalb des Schrankes mit den Wasserdämpfen niederzuschlagen bzw. abzutöten. Zwei größere runde Löcher in einer der verglasten Kastenwandungen dienen zur Einführung der Hände in den Impfschrank. Sämtliche Arbeiten gehen also in dem vorher mit Wasserdämpfen durchströmten Schrankraum vor sich. So willkommen derartig eingerichtete Impfschränke zuerst erschienen, so befriedigte das Arbeiten mit ihnen auf die Dauer in mancher Hinsicht doch nicht ganz, obwohl das Prinzip, nach dem sie gebaut sind, gut geheißen werden muß.

Nachteilig empfand ich immer das Beschlagen der inneren Glaswände mit Wasserdämpfen, wodurch die Sicht über den Arbeitsplatz verloren geht. Unangenehm ist auch, trotz des eigens für das Kondenswasser eingerichteten Abflusses, das Naßwerden des ganzen Kastenbodens, der als Arbeitsplatz trocken sein sollte. Zudem tropft häufig von der Decke des Kastens während des Arbeitens Kondenswasser auf die Hände und Instrumente, selbst in gerade zu dieser Zeit geöffnete Kulturgefäße herab und verspritzt beim Aufprall, was sicher bei von vornherein beabsichtigtem aseptischen Arbeiten nicht von Vorteil ist.

Um die erwähnten und andere Unannehmlichkeiten auszuschalten, entstand aus langjähriger Praxis heraus der im folgenden beschriebene neue Impfschrank. Bei seiner Konstruktion habe ich zur Keimfreihaltung des Impfschrankes zum Teil Erfahrungen berücksichtigt, die sich aus der Anwendung leicht verdunstender Desinfektionsmittel bei der Kaltsterilisation ergaben (2). Nach reiflicher Erwägung sind dabei ältere Arbeitsgrundsätze beibehalten worden, die auch im Impf-

[1] DRGM. der Firma *Wagner & Munz*, München.

schrank nicht außer acht gelassen werden können, sondern, entsprechend angewendet, die Vorteile des neuen Impfkastens gerade vervollständigen. Nicht zuletzt sind ferner bei seinem Bau Methoden berücksichtigt worden, die den Impfschrank auch zu Arbeiten mit menschlichen, tierischen und pflanzlichen Explantaten geeignet machen.

Beschreibung des Impfschrankes.

Die Ausmaße des Impfschrankes tragen einer bequemen, ungezwungenen Arbeitsweise Rechnung. Er ist aus Holz gebaut und als DRGM. gesetzlich geschützt.

Alleinhersteller ist die Firma *Wagner & Munz*, Apparatebau für Chemie, Bakteriologie und Mikroskopie usw., München, Karlstr. 43. Der Schrank mißt in der Länge 45 (etwa Brustbreite), in der Tiefe 40 und in der Höhe 36 cm. Rückwand, Decke und Vorderseite des Kastens sind verglast, die beiden Seitenwände und der Boden sind massiv aus Holz (Abb. 1, I). Um das ganze Arbeitsfeld im Schrank in aufrecht sitzender Stellung bequem überblicken zu können (der Impfschrank ruht auf einem Tisch), ist die Vorderseite des Kastens zum größten Teil abgeschrägt, und nur ein kleiner Teil verläuft senkrecht zum Kastenboden. Infolge der Abschrägung der Vorderwandung mißt die verglaste Deckenwandung in der Tiefe, gegenüber der Bodentiefe von 40 cm des Kastens, nur 18 cm. Boden, Seitenwände, Rückwand und Decke sind fest zusammengefügt, während die Vorderseite eine mit der Deckenwandung des Kastens durch Scharniere verbundene, nach oben aufklappbare Tür bildet Diese Tür selbst zerfällt in zwei wiederum durch Scharniere verbundene, verschieden große Teile, in die große schräg zum Boden verlaufende *a*, und die dieser anhängende, zum Boden senkrecht stehende kleine Tür *b*. Die Ränder der Seitenwände und die auf den Seitenwänden aufsitzenden Türrahmen sind mit dünnen Gummi- oder Filzbändern beklebt, so daß die Türen dicht schließen. Weiterhin wird der Verschluß der großen Tür *a* durch zwei an den beiden Seitenwänden angebrachte Riegelhaken *c* und *d* gewährleistet. Die kleine, schmale Tür *b* von 5 cm Höhe trägt ein Schnappschloß *e*, so daß sie bei Bedarf während des Arbeitens im Schranke von innen her nach außen aufgestoßen und wieder geschlossen werden kann, um gegebenenfalls kleinere Gegenstände (niedere Schalen, Instrumente usw.) aus dem Kasten heraus oder in ihn hineinbringen zu können. Zum Schutze gegen das Eindringen fremder Keime von den Seiten her bei geöffneter, kleiner Tür *b* ist diese an den beidenEnden der Schmalseiten nach innen zu mit etwa dreiviertelkreisförmigen Holzscheiben (Ohren) versehen, die zur Deckelfläche senkrecht stehen (Abb. 1, II, *f*; III, *f* und *g*). Die kleine Tür *b* kann, wie aus dem Gesagten hervorgeht, für sich allein geöffnet werden (Abb. 1, III). Beide

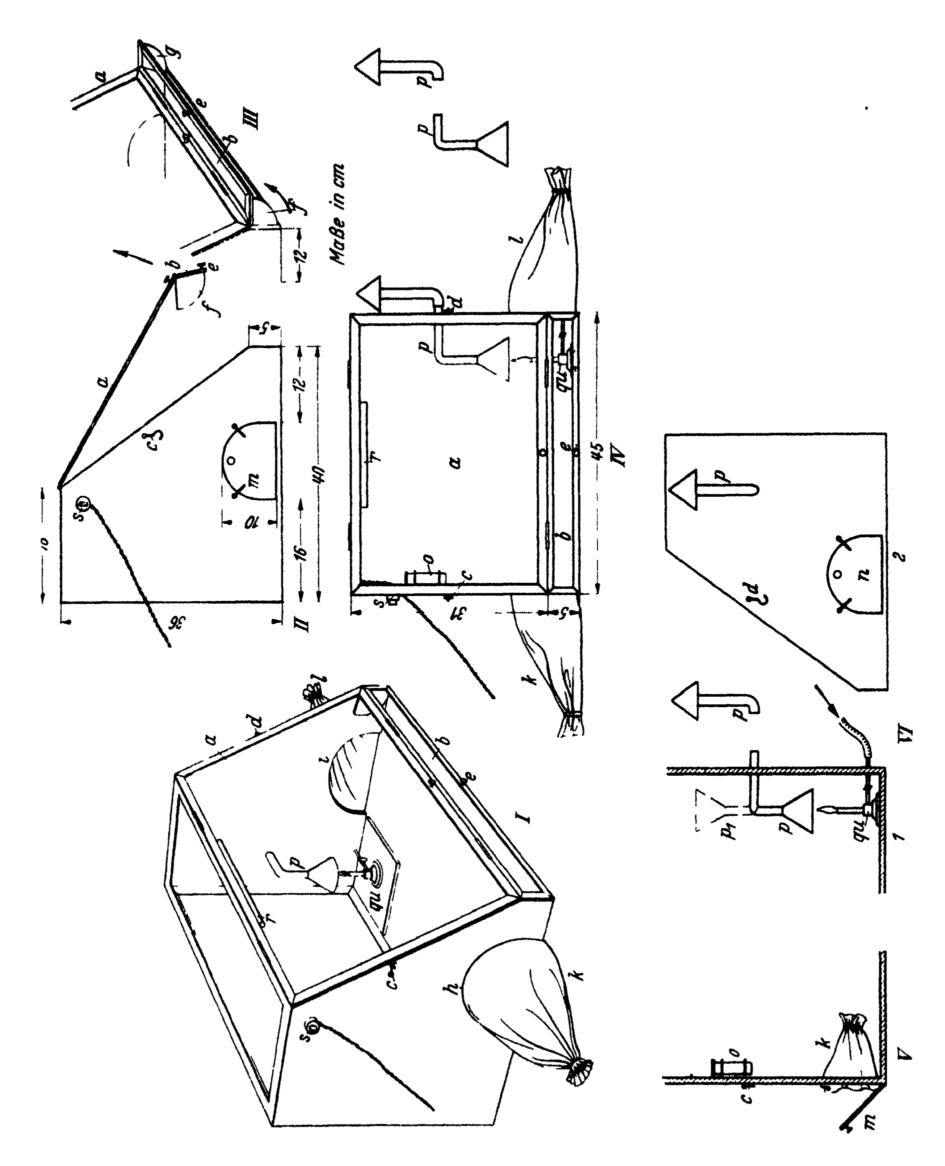


Abb. 1. *Impfschrank nach Schweizer.*

I. Gesamtansicht. II. Aufsicht auf die linke Seitenwand bei eingestülpter Gummimanschette und geschlossenem Deckel *m*. Die zusammengesetzte Türe *a* und *b* (Vorderseite) geöffnet. III. Unterer Teil der Vorderseite mit geöffnetem, kleinem Türteil *b*. IV. Aufsicht auf die Vorderseite des Schrankes bei geschlossenen Türen *a* und *b* und nach außen gestülpten Gummimanschetten *k* und *l*. V. Aufsicht auf die vordere Stirnseite der linken Seitenwand bei in den Schrank eingestülpter Gummimanschette *k* und halb geöffnetem Deckel *m*. VI. 1. Rechter, hinterer Schrankraum mit Gasmikrobrenner *qu* und Abzugsrohr *p* (Vertikalschnitt). 2. Aufsicht auf die rechte Seitenwand bei eingestülpter Gummimanschette und geschlossenem Deckel *n* und auf den außerhalb des Schrankes verlaufenden Teil des Abzugsrohres *p*. (Nähere Erklärung im Text.)

Türen *a* und *b* können aber auch, weil durch Scharniere miteinander verbunden, zusammen aufgeklappt werden (Abb. 1, II), was hauptsächlich beim Reinigen des Schrankinnern (Ausreiben mit Carbolwasser, Lysolwasser, Formalin, Sublimatalkohol u. dgl.) oder beim Einbringen größerer Arbeitsutensilien in Frage kommt.

Die beiden massiven Seitenwände enthalten je eine etwa halbkreisförmige Öffnung *h* und *i*. Die Ausmaße sind aus der Zeichnung ersichtlich. Am Rande der Öffnungen bzw. auf ihrer peripheren Wandung sind etwa 20 bis 25 cm lange, ärmelförmige Gummistoffmanschetten *k* und *l* dicht angebracht, die genau der lichten Weite dieser Öffnungen entsprechen, und zwar so, daß die Manschetten von den Außenseiten des Impfschranks her die schlauchförmigen Zugänge für die Hände nach den Öffnungen (*h* und *i*) und zum Innern des Kastens bilden. In der Nähe der nach außen stehenden Enden sind an den Manschetten Züge angebracht. Die Züge gewähren einen besseren Abschluß an den Handgelenken nach Einbringung der vorher desinfizierten Hände in die Manschetten. Bei Nichtbenutzung des Impfschranks sind die Gummimanschetten in das Schrankinnere eingestülpt und die halbkreisförmigen Öffnungen mit entsprechenden, durch Riegel gehaltenen Holzdeckeln verschlossen (Abb. 1, II, *m*; V, *m* und VI *n*). Abb. 1, V gibt die Aufsicht auf die vordere Stirnseite der linken Seitenwand wieder. Der Holzdeckel *m* ist halb geöffnet und die Gummimanschette ins Innere des Impfschranks eingestülpt.

An der Innenseite der linken Seitenwand ist im oberen, der Rückwand des Kastens nächstliegenden Viertel ein Praparatengläschen von etwa 20 ccm Inhalt befestigt, das abgenommen werden kann und zur Aufnahme der später zu besprechenden Desinfektionsmittel dient (Abb. 1, IV, *o* und V, *o*).

Die hintere Hälfte der rechten Seitenwand ist in etwas mehr als halber Höhe durchbohrt. Durch diese Durchbohrung führt, wie die Abb. 1 (I, IV und VI_1 und VI_2) zeigt, ein zweimal rechtwinklig gebogenes Abzugsrohr *p* aus Kupferblech von höchstens 2 cm Durchmesser, das auseinandernehmbar ist. Der äußere Abzugsrohr- oder Schornsteinteil kann also auf den aus der rechten Seitenwand des Kastens herausragenden Teil aufgesteckt werden und trägt oben eine Haube, um das Hereinfallen von fremden Keimen in den Schornstein zu verhindern. Bei Nichtgebrauch des Abzugsrohres tritt an Stelle des äußeren aufsteckbaren Ansatzrohres ein Korkverschluß. Der hauptsächlich im Innern des Schrankes verlaufende Rohrteil *p* ist mit seinem Ende nach abwärts gerichtet und zu einem kleinen Trichter erweitert. Dieses durch die rechte Seitenwand verlaufende Rohrstück kann in der Wanddurchbohrung um 180^0 gedreht werden, so daß das Trichterende bei

Nichtgebrauch des Abzugsrohres senkrecht nach oben zeigt (Abb. 1, VI, p_1). Bei Gebrauch des Abzugsrohres zeigt die Trichteröffnung im Schrank nach unten Unter der trichterförmigen Öffnung befindet sich ein kleines Spirituslämpchen (Abb. 1, *qu*). Noch besser ist ein Gasmikrobrenner, dessen Gaszuleitung von außen her durch eine Wanddurchbohrung fuhrt (Abb. 1, IV, *qu* und VI, *qu*).

Außerdem enthält der Impfschrank zur Beleuchtung noch eine elektrische Birne *r* (Stabbirne), deren Stromzuleitung von außen her in das Innere des Schrankes führt. Der Ausschalter *s* befindet sich an der Außenseite der linken Seitenwand. Die am vorderen Holzrahmen der Schrankdecke angebrachte Birne ist von einem Schirm umgeben, der das Licht auf den Boden des Impfkastens wirft, so daß eine Blendung der Augen beim Arbeiten ausgeschlossen ist. Am besten wird der Impfschrankboden in seiner ganzen Flache noch mit einer dünnen Glasplatte belegt. Im ubrigen werden die Innenwandungen des Impfkastens nicht mit Farbe oder irgendeinem Lack bestrichen, so daß der Schrank bei Bedarf jeweils mit einem der eingangs erwähnten Desinfektionsmittel feucht ausgerieben werden kann. Sollen die Innenwände doch irgendeinen Anstrich erhalten, so ist fur diesen Zweck Carbolineum zu empfehlen

Keimfreihaltung und Anwendung des Schrankes.

Vor erstmaliger Benutzung wird der Schrank mit einer wasserigen oder alkoholischen Losung irgendeines der ublichen Desinfektionsmittel feucht ausgerieben Zur weiteren Keimfreihaltung des Schrankinnern bedient man sich langsam verdunstender Desinfektionsstoffe in flüssiger oder fester Fo m, deren Dampfe *nicht brennbar* sein durfen, falls später (was in den meisten Fallen zutreffen durfte) im Schrank zwecks Ausgluhens von Platindraht, Skalpell, Lanzette usw. mit einem Spiritus- oder Gasflammchen gearbeitet werden soll Geeignet sind vor allem krist Carbolsaure (DAB. VI), Kreosot und Formalinlösung, besser aber Formalin in Tablettenform. In vielen Fallen benutze ich auch kristallisiertes Jod oder Jodoform in kleinen Mengen Selbst metallisches Quecksilber kann in extremen Fallen als Desinfektionsmittel in Frage kommen. Bei Verwendung von Quecksilber oder Jod kann man während des Arbeitens nach Belieben noch die bekannten dunnen Gummioperationshandschuhe tragen, absolut notwendig ist es aber nicht, da ja die Arbeiten innerhalb des Schrankes jeweils nur kürzere Zeit in Anspruch nehmen. Ich selbst benutze meistens kristallisierte, reine Carbolsäure mit oder ohne geringen Jodzusatz, Formalintabletten, wie sie bei den Desinfektionslampen benutzt werden, oder geringe Mengen Jodoform. Auch mit Brom getrankte Kieselgur habe ich schon

benutzt; davon bedarf es nur ganz geringer Mengen (2 bis 3 Tropfen Brom + 5 g Kieselgur).

Das Desinfektionsmittel wird in kleinen Mengen in das an der linken Innenseitenwand befindliche Gläschen *o* gegeben, das dann offen bleibt. Etwa dauernd im Impfschrank gebrauchte Utensilien, wie Platindraht, Glasnadeln, Glasspatel, kleine Skalpelle und Taschenfeuerzeug zum Anzünden des Gas- oder Spiritusflämmchens, können gleichzeitig schon mit in den Schrank gegeben, aber auch später erst, etwa durch Abreiben mit Alkohol vordesinfiziert, kurz vor Benutzung des Schrankes durch dessen kleine Türe *b* in das Innere gebracht werden. Das Einbringen von Metallutensilien (Rasiermesser, Skalpelle usw.) in den Schrank erst kurz vor Beginn der Arbeiten ist namentlich zu empfehlen, wenn Desinfektionsmittel angewendet werden, deren Dämpfe Metalle stark angreifen. Nach Einbringung des Desinfektionsmittels ist der allseits verschlossen gehaltene Schrank nach Verlauf kurzer Zeit eigentlich für immer gebrauchsfertig. Die kleinen Mengen des Desinfektionsmittels, die innerhalb des Schrankes dauernd verdunsten und somit auch etwas in die Schrankwandungen eindringen, genügen, den Innenraum des Kastens auf die Dauer steril und stets gebrauchsfertig zu erhalten, natürlich nur, wenn inzwischen nicht die ganze Vorderseite des Schrankes allzu lange offen gehalten wurde. Ist der Impfkasten außer Gebrauch, so werden samtliche Öffnungen geschlossen, wobei die Gummimanschetten nach innen gestülpt sind. Auch wird der äußere Teil des Abzugsrohres abgenommen und durch Korkverschluß ersetzt.

Außer zu Impfzwecken eignet sich der eben beschriebene Impfschrank auch gut für das Arbeiten mit Explantaten. So können größere, abgetrennte menschliche, tierische und pflanzliche Gewebestücke in einer sterilen *Petri*-Schale durch die kleine Tür *b* gegeben werden. Innerhalb des Schrankes werden dann auf einer kleinen Glas- oder Porzellanplatte aus größeren Stücken die für die betreffenden Gewebekulturen bestimmten kleineren Gewebestückchen heraus- und zurechtgeschnitten und sogleich zur Weiterkultur auf die vorbereiteten, sterilen Nährböden gegeben.

Beim Arbeiten mit der Flamme (Ausglühen von Instrumenten oder Durchziehen von Deckgläsern und Objektträgern) ist zu beachten, daß die Flamme nicht zu groß ist. Es genügt eine Flammenhöhe von höchstens 2 cm.

Hat man sich einmal an das Arbeiten im Impfschrank gewöhnt, so ist es ein leichtes, selbst Rasiermesserschnitte von Objekten innerhalb des Kastens herzustellen, die zur Gewebezüchtung verwendet werden können oder vor Luftinfektion geschützt werden sollen. Platz hierfür

ist im Schrank genügend vorhanden. Am besten eignen sich für solche Zwecke kleinere Rasiermesser (sogenannte Reiserasiermesser). Auch Rasierklingen können mit Vorteil benutzt werden. Ich stellte auch schon öfters innerhalb des Impfkastens auf einem kleinen, einfachen, zylinderförmigen Handmikrotom pflanzliche Mikrotomschnitte her, die dann zur Gewebezüchtung verwendet wurden.

So gut der keimfreie Impfkasten zur Herstellung von Schnitten dienen kann, so gut eignet er sich auch für das Umbetten von Explantaten von verbrauchten auf neue Nährböden, wenn nicht dieses Umbetten überhaupt umgangen wird, wie dies bei einigen anderen Kulturmethoden für Explantate der Fall ist [(2), Abschnitt Gewebezüchtung]. Auf alle Fälle entspricht die Verwendung des neuen Impfschrankes in botanischen, zoologischen, medizinischen und biologischen Laboratorien usw. allen Anforderungen.

Anmerkung: Um etwaigen Einwänden bezüglich der Verwendung des hier beschriebenen Impfschrankes schon von vornherein entgegenzutreten, soll an dieser Stelle kurz einiges zur näheren Erklarung erörtert werden. Es könnte z. B. der Gedanke auftauchen, daß während des Arbeitens mit impfbereiten Nährböden innerhalb des Schrankes Dämpfe der Sterilisationsmittel in die Nährböden eindringen, die nachträglich nicht mehr so leicht aus diesen zu entfernen wären. Hierzu ist etwa folgendes zu sagen: Nach mehrtägigem Stehen des bis zur Benutzung allseits verschlossenen Impfschrankes ist wohl die Luft in ihm mit aus dem Gläschen verdunsteten Desinfektionsmitteln erfüllt. Bei Inbetriebnahme des Schrankes wird nun der Korkverschluß vom Flammenabzugsrohr abgenommen und der außerhalb des Schrankes verlaufende Rohrteil aufgesetzt. Nach dem Anzünden der Mikroflamme zieht, was ich immer wieder nachzuprüfen Gelegenheit hatte, die mit den Desinfektionsmitteln gesattigte und sich erwärmende Luft durch das Abzugsrohr ab, und die Gefahr, daß etwa noch vorhandene desinfizierende Dämpfe in die Nahrböden eindringen und Schaden anrichten, ist beseitigt. Es wurden seinerzeit Versuche mit Nährböden in *Petri*-Schalen und Reagensgläsern angestellt, die absichtlich lange innerhalb des Schrankes bei angezündeter Mikroflamme belassen wurden. Bei diesen Prüfungen konnten wohl nach Entnahme der Kulturgefäße an diesen äußerlich sowie an den aus den Reagensgläsern herausragenden Teilen der Wattestopfen die angewendeten Desinfektionsstoffe mittels des Geruchssinns noch kurze Zeit wahrgenommen werden, besonders, wenn der Desinfektionsstoff kleine Mengen Jodoform enthielt. Diese Erscheinung kann m. E. nicht schädlich, sondern nur nützlich sein. Bei Abnahme der Deckel und Wattestopfen waren in diesen Fällen durch den Geruchssinn innerhalb der Gefäße und mithin auch auf den

Nährböden keine Desinfektionsmittel festzustellen, ebensowenig auf makro- und mikrochemischem Wege. Trotz dieser Feststellung wurden derartige Nährböden mit empfindlichen Mikroben beimpft. Auch hier zeigten sich gegenüber den ebenfalls beimpften, als Kontrolle dienenden Nährböden, die nicht mit dem Schrankinnern in Berührung gekommen waren, keine Wachstumshemmungen, was doch hätte der Fall sein müssen, wenn beträchtliche Mengen Desinfektionsstoffe innerhalb des Schrankes in die Nährböden eingedrungen wären. Zudem ist zu bemerken, daß ja die Impfarbeiten niemals stundenlang dauern, sondern, wenn hierzu alles gut vorbereitet ist. im Einzelfalle höchstens einige wenige Minuten in Anspruch nehmen.

Literatur.

1) *E. Küster*, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. Berlin-Leipzig, B. G. Teubner, 1913. S. 62. — 2) *Gg. Schweizer*, Einführung in die Kaltsterilisationsmethode. Jena, Gust. Fischer, 1937.

(Laboratory of Microbiology, Technical University, Delft, Holland.)

The production of caproic and butyric acids by the methane fermentation of ethyl alcohol.

By

H. Albert Barker[1].

With 1 figure in the text.

(Eingegangen am 16. September 1937.)

In a previous paper (*Barker*, 1936 b) it was shown that one type of methane bacterium is able to convert ethyl alcohol quantitatively to acetic acid, at the same time reducing an equivalent amount of carbon dioxide to methane according to the equation

$$2\,C_2H_5OH + 2\,H_2O + CO_2 \rightarrow 2\,CH_3COOH + CH_4 + 2\,H_2O. \quad (1)$$

The work referred to was carried out with impure cultures and it is therefore not surprising that when attempts were made to repeat the experiments, the fermentations sometimes followed a different course from that originally observed. In the present paper a methane fermentation of ethyl alcohol is described in which large quantities of butyric and caproic acids are formed in addition to acetic acid.

The cultures producing higher acids from ethyl alcohol were obtained by the same methods previously described for the enrichment of alcohol fermenting methane bacteria. Frequently such cultures produce only acetic acid, but more commonly a strong odor of higher acids and alcohols immediately indicates the presence of other compounds as well. The idea at once suggests itself that in the second, more complex type of fermentation, also other organisms are active. This can be readily confirmed by a microscopical examination of the sediment present in the fermentation flasks. While in the simple acetate fermentation, typical rods of *Methanobacterium Omelianskii* greatly predominate, the sediments from the other type of fermentation show in addition large numbers of spore-forming bacteria of the *Plectridium* type. (Fig. 1, p 416). The study of the bacteria has not progressed far enough to indicate whether the spore-formers alone, or the two types of bacteria acting together are responsible for the formation of higher acids, though the latter possibility

[1] Division of Plant Nutrition, University of California, Berkeley, California. The author takes great pleasure in expressing his indebtedness to Prof. *A. J. Kluyver* for extending the hospitality of the Delft laboratory and for his interest, encouragement and advice during the progress of the work.

seems the more probable for reasons which will be given below. Both types of organisms were present in all of the cultures studied.

The fermentation experiment to be described was carried out under the same conditions as the previous experiment on the methane fermentation (*Barker*, 1936 b). The medium consisted of 2100 ccm of a solution containing at the time of inoculation approximately 1.5% ethyl alcohol and 1% calcium carbonate in addition to the essential mineral salts. The initial analysis was made seven days after inoculation. The fermentation was then allowed to proceed for another thirty days at 30° C before being again analyzed.



Fig. 1. Sediment from the complex type of fermentation, containing besides the thin rods of *Methanobacterium Omelianskii* large numbers of spore-forming bacteria of the *Plectridium* type.

A preliminary examination of the volatile acids from the fermented culture showed that an acid or mixture of acids was present which was not miscible in all proportions with water but separated as a less dense oily layer. The very limited solubility of the material indicated that it must contain caproic or higher acids. It became necessary to make a careful examination of the volatile acids in order to establish their identity.

For this purpose the volatile acids from the greater part of the culture medium (2000 ccm) were separated by steam distillation, and the distillate, which contained about 2500 ccm of 0.1 n acid, was neutralized and concentrated to 500 ccm. Samples of this solution were then examined for the presence of various acids. Formic acid could be proved to be absent by the mercuric chloride reduction test. Before applying specific tests for other acids, a separation of the higher fatty acids from any acetic and propionic acids that might be present was effected by taking advantage of the differential solubility of the copper salts in ether. In the fraction of the copper salts not extractable by ether, acetic acid was identified microchemically as sodium uranyl acetate. There was also present in this fraction a small amount of a higher fatty acid which was identified as butyric acid by the form and the characteristic anomalous birefringence of the double salt of calcium barium acetate butyrate. This reaction proved at the same time that propionic acid could not have been present in appreciable quantities.

From the ether solution of the copper salts of the higher fatty acids the ether was removed by distillation and the free acids were liberated by addition of an excess of sulphuric acid. The acids were then separated by

distillation, neutralized with dilute caustic soda, and from this solution the silver salts were fractionally precipitated by addition of silver nitrate.

The silver content of the various fractions was determined with the following results: first fraction 49.1%; second 49.9%; third 50.9%; fourth 56.1%; fifth 56.9%. These figures seemed to indicate that the material in question was mainly a mixture of caproic acid (silver content of the silver salt 48.4%) and of butyric acid (silver content of the silver salt 55.3%).

In order to make this conclusion more convincing a larger quantity of the higher fatty acids was separated from the lower acids, and the caproic and butyric acids were separated from each other as completely as possible by making use of their different solubilities in water and their different rates of distillation. From the two fractions obtained in this way the silver salts were again prepared and analyzed. The silver content of the salt of the least soluble fraction proved to be 49.2% and of the more soluble fraction 55.4%. We feel that we may conclude from these results that the higher fatty acids indeed consist of caproic and butyric acids. The first mentioned results of the analysis of the five successive fractions of silver salts make it most improbable that either valeric acid or any acid higher than caproic was present in addition to the acids already identified.

The next step was, of course, to estimate the quantities of the various acids formed in the experiment under consideration. This was done by applying the principle of the *Duclaux* distillation to the analysis of a mixture of three acids, as has been done by *Schmidt* (1932). It must be observed, however, that the general formulae given by him are incorrect. For our own calculations we used the relations:

$$A = z - B - C, \tag{2}$$

$$B = \frac{100Z - az + C(a - c)}{(b - a)}, \tag{3}$$

$$C = \frac{100Z(a' - b') - 100Z'(a - b) + z(ab' - a'b)}{(b - a)(c' - a') + (a - c)(b' - a')} \tag{4}$$

where A, B and C are the quantities expressed in terms of titratable acidity of the three acids present; a, b and c are the percentages of the total quantities of each acid which have been collected in the distillate after a definite portion of the liquid has been distilled over; a', b' and c' are the same percentages when some other portion of the liquid has been distilled over; z is the total acidity; Z is the acidity present in the portion to which a, b and c refer; and Z' is the acidity present in the portion to which a', b' and c' refer.

The results of the analysis are collected in Tables I and II. The carbon balance given in the latter shows that the method applied is indeed quite adequate for the purpose.

Table I shows the actual quantities of the various substances at the beginning and at the end of the experiment. It should be remarked that at the beginning of the experiment the fatty acids were not present in sufficient quantities to permit of their detailed analysis. The figures given in column 2 were therefore calculated from the titratable acidity on the assumption that the three acids were present in the same ratio as was determined in the final analysis. This assumption was supported by the distillation values obtained in the application of *Johnson*'s (1932) micromethod for the estimation of volatile acids.

Table I. Methane fermentation of ethyl alcohol.

Substance	Initial g	Final g	Difference g
Ethyl alcohol	28.80	8.04	− 20.76
Acetic acid	0.91	10.00	+ 9.09
Butyric acid	0.53	5.82	+ 5.29
Caproic acid	0.64	7.05	+ 6.41
Carbon dioxide	9.74	4.33	− 5.41
Methane	—	2.03	+ 2.03

In Table II the results given in Table I are presented in the form of carbon and oxidation-reduction balances. Columns 1 and 2 are self-explanatory. Column 3 gives the distribution of carbon in the substrates and in the products expressed as a percentage of the total carbon present in the compounds consumed (ethyl alcohol and carbon dioxide). In column 4 are given the quantities of substrates and fermentation products expressed in millimols In column 5 the milli-equivalents of „available hydrogen" present in the observed quantities of each compound have been given. By available hydrogen is meant the quantity of hydrogen which would be available for reduction as a result of the complete dehydrogenation of an organic compound to carbon dioxide. The quantity of available hydrogen[1] must be the same in the fermentation products as in the substrate.

In column 6 the amounts of available hydrogen are expressed as percentages of the amount present in the fermented substrate, that is, in the alcohol consumed, since carbon dioxide has a hydrogen value of zero.

In Table II it will be seen that there is a very satisfactory agreement between the figures for total carbon and total available hydrogen in

[1] For a further explanation of this term the reader is referred to the discussion by *Barker* (1936 a).

the substrates and in the products formed. This indicates that no products occurring in considerable quantities have escaped detection.

Table II. Carbon and oxidation-reduction balances of methane fermentation of ethyl alcohol.

Substance	g	% of carbon	Milli-mols	Milli-equivalents of available hydrogen	% available hydrogen
Substrates					
Carbon dioxide ...	5.41	12.0	122.9	—	—
Ethyl alcohol	20.76	88.0	451.5	5418	100
Total		100		5418	100
Products recovered					
Methane	2.03	12.3	126.8	1014	18.7
Acetic acid ...	9.09	29.6	151.7	1214	22.4
Butyric acid	5.29	23.4	60.1	1202	22.2
Caproic acid	6.41	32.3	55.2	1766	32.6
Total		97.6			95.9

It should be added that the odor of the fermented medium strongly suggests the presence of some higher alcohol, possibly caproic alcohol. No attempt was made to estimate the amount of this alcohol. However, on the basis of the fermentation balance it can be predicted that the quantity formed is very small.

It may at once be pointed out that despite the apparent complexity of this fermentation the data are in complete agreement with the view that methane is formed by a reduction of carbon dioxide. Methane and carbon dioxide have been produced and consumed, respectively, in nearly equimolecular quantities

This result implies that all products formed besides methane must be considered as dehydrogenation products of alcohol. Roughly 34 % of the alcohol has been converted into acetic acid, 27 % into butyric acid and 37 % into caproic acid. The origin of acetic acid according to the equations.

$$CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHO + 2\,H \qquad (5)$$

and

$$CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2\,H \qquad (6)$$

is easily acceptable. For the higher acids it is impossible to escape the conclusion that they have been formed by a condensation of a C_2-compound, most probably acetaldehyde. In the butyric acid fermentation of sugar it is often postulated that this acid arises according to the equation

$$2\,CH_3CHO \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH. \qquad (7)$$

The results of the analysis are collected in Tables I and II. The carbon balance given in the latter shows that the method applied is indeed quite adequate for the purpose.

Table I shows the actual quantities of the various substances at the beginning and at the end of the experiment. It should be remarked that at the beginning of the experiment the fatty acids were not present in sufficient quantities to permit of their detailed analysis. The figures given in column 2 were therefore calculated from the titratable acidity on the assumption that the three acids were present in the same ratio as was determined in the final analysis. This assumption was supported by the distillation values obtained in the application of *Johnson*'s (1932) micromethod for the estimation of volatile acids.

Table I. Methane fermentation of ethyl alcohol.

Substance	Initial g	Final g	Difference g
Ethyl alcohol	28.80	8.04	− 20.76
Acetic acid	0.91	10.00	+ 9.09
Butyric acid	0.53	5.82	+ 5.29
Caproic acid	0.64	7.05	+ 6.41
Carbon dioxide	9.74	4.33	− 5.41
Methane	—	2.03	+ 2.03

In Table II the results given in Table I are presented in the form of carbon and oxidation-reduction balances. Columns 1 and 2 are self-explanatory. Column 3 gives the distribution of carbon in the substrates and in the products expressed as a percentage of the total carbon present in the compounds consumed (ethyl alcohol and carbon dioxide). In column 4 are given the quantities of substrates and fermentation products expressed in millimols. In column 5 the milli-equivalents of „available hydrogen" present in the observed quantities of each compound have been given. By available hydrogen is meant the quantity of hydrogen which would be available for reduction as a result of the complete dehydrogenation of an organic compound to carbon dioxide. The quantity of available hydrogen[1] must be the same in the fermentation products as in the substrate.

In column 6 the amounts of available hydrogen are expressed as percentages of the amount present in the fermented substrate, that is, in the alcohol consumed, since carbon dioxide has a hydrogen value of zero.

In Table II it will be seen that there is a very satisfactory agreement between the figures for total carbon and total available hydrogen in

[1] For a further explanation of this term the reader is referred to the discussion by *Barker* (1936 a).

the substrates and in the products formed. This indicates that no products occurring in considerable quantities have escaped detection.

Table II. Carbon and oxidation-reduction balances of methane fermentation of ethyl alcohol.

Substance	g	% of carbon	Milli-mols	Milli-equivalents of available hydrogen	% available hydrogen
Substrates					
Carbon dioxide ...	5.41	12.0	122.9	—	—
Ethyl alcohol	20.76	88.0	451.5	5418	100
Total		100		5418	100
Products recovered					
Methane	2.03	12.3	126.8	1014	18.7
Acetic acid	9.09	29.6	151.7	1214	22.4
Butyric acid	5.29	23.4	60.1	1202	22.2
Caproic acid	6.41	32.3	55.2	1766	32.6
Total		97.6			95.9

It should be added that the odor of the fermented medium strongly suggests the presence of some higher alcohol, possibly caproic alcohol. No attempt was made to estimate the amount of this alcohol. However, on the basis of the fermentation balance it can be predicted that the quantity formed is very small.

It may at once be pointed out that despite the apparent complexity of this fermentation the data are in complete agreement with the view that methane is formed by a reduction of carbon dioxide. Methane and carbon dioxide have been produced and consumed, respectively, in nearly equimolecular quantities.

This result implies that all products formed besides methane must be considered as dehydrogenation products of alcohol. Roughly 34 % of the alcohol has been converted into acetic acid, 27 % into butyric acid and 37 % into caproic acid. The origin of acetic acid according to the equations.

$$CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHO + 2\,H \quad (5)$$

and

$$CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2\,H \quad (6)$$

is easily acceptable. For the higher acids it is impossible to escape the conclusion that they have been formed by a condensation of a C_2-compound, most probably acetaldehyde. In the butyric acid fermentation of sugar it is often postulated that this acid arises according to the equation

$$2\,CH_3CHO \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH. \quad (7)$$

The evidence for this mode of origin of butyric acid in carbohydrate fermentation is only, however, of an entirely indirect nature. The results of the experiment under consideration give, on the contrary, direct evidence as to the correctness of this assumption. In an entirely similar way the caproic acid may be supposed to arise from a condensation of three molecules of acetaldehyde followed by a hydrogenation:

$$3\,CH_3CHO + 2\,H \rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COOH + H_2O. \quad (8)$$

Since acetaldehyde is the first dehydrogenation product of ethyl alcohol, the formation of the various acids from this substance does not interfere with the general conception that methane fermentation is essentially a carbon dioxide hydrogenation coupled with a dehydrogenation of the organic substrate.

What relation exists between these various condensation reactions and the reduction of carbon dioxide to methane? The main quantity of methane must have been derived from the reaction

$$4\,CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow 4\,CH_3CHO + CH_4 + 2\,H_2O. \quad (9)$$

However, since the quantity of methane formed (127 millimols) is greater than can be accounted for by reaction 9 (113 millimols), another smaller amount of methane must have been formed by a further dehydrogenation of acetaldehyde according to the equation

$$4\,CH_3CHO + 4\,H_2O + CO_2 \rightarrow 4\,CH_3COOH + CH_4 + 2\,H_2O. \quad (10)$$

Yet the amount of acetic acid formed is not an exact measure for the extra methane produced, since a good deal of the hydrogen derived from the acetaldehyde is required in the hydrogenation reaction involved in the production of caproic acid according to the equation

$$4\,CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COOH + CH_3COOH + H_2O. \quad (11)$$

In fact, it is evident that reaction 10 has proceeded only to a slight extent, sufficient to produce 14 millimols of methane. That is, not more than 12.4 % of the acetaldehyde (56 out of 452 millimols) has undergone this conversion. These considerations show that there are clearly two classes of reactions involved in this fermentation: those involving a reduction of carbon dioxide to methane (equations 9 and 10), and those not involving such a reduction (equations 7 and 11). Now the reactions of the first class are the same as occur in the simple methane fermentation of alcohol and are undoubtedly brought about by the methane bacteria proper. It seems highly probable, though no definite proof can be offered at present, that the reactions not involving carbon dioxide reduction are due entirely to the associate sporeforming bacteria. The latter evidently live exclusively upon acetaldehyde which has been

produced in the intermediate metabolism of the methane bacteria. Only studies with pure cultures of both organisms can of course definitely decide whether this interpretation is correct.

Needless to say, the results reported above are most remarkable, the production of butyric and caproic acids from ethyl alcohol being quite contrary to expectation. Only after a careful search of the literature did we find that already in 1868 *A. Béchamp* had observed a similar conversion. His observation has been, however, practically forgotten, since no reference to it has been found in modern bacteriological literature. *Béchamp* described an experiment in which he obtained 75 grams of a sample of crude caproic acid (evidently containing a good deal of butyric acid) from 106 grams of ethyl alcohol.

Summary.

A fermentation of ethyl alcohol under the influence of *Methanobacterium Omelianskii* and an associated spore-forming bacterium is described in which the alcohol is converted into acetic, butyric and caproic acids. At the same time there occurs a reduction of carbon dioxide to methane. The data provide direct evidence for the formation of butyric and caproic acids by a condensation of a C_2-compound which probably is acetaldehyde.

Bibliography.

H. A. Barker (a), Proc. Kon. Akad. v. Wet. A'dam **39**, 677, 1936. — *Derselbe* (b), Arch. f. Mikrobiol. **7**, 404, 420, 1936. — *A. Béchamp*, Ann. Chim. phys. (4) **18**, 103, 1868. — *M. J. Johnson*, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **4**, 20, 1932. — *J. Schmidt*, In: *G. Klein*, Handbuch der Pflanzenanalyse **2**, 406, 1932.

(Aus dem Carlsberg Laboratorium in Kopenhagen.)

Der Einfluß der Wuchsstoffe auf die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe.

Von

Niels Nielsen.

(Eingegangen am 17. September 1937.)

Vor kurzem (*Nielsen* 1937) wurde eine Methode beschrieben, mit der man einen zahlenmäßigen Ausdruck für die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe bekommen konnte, d. h. für die Geschwindigkeit, mit der Hefe, die in destilliertem Wasser aufgeschlemmt ist, zu Boden sinkt. Diese Senkungsgeschwindigkeit ist selbstverständlich von verschiedenen Faktoren abhängig, von der Größe der Hefezellen, von der Form und dem spezifischen Gewicht, von der Agglutination oder Flockung, d. h. von der Zusammenballung der einzelnen Hefezellen zu größeren oder kleineren Klumpen; dieser letzte Faktor ist sicher von sehr großer Bedeutung für die Senkungsgeschwindigkeit.

Versuche, die mit der genannten Methode angestellt wurden, zeigten, daß die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe in hohem Grade von den Bedingungen abhängig ist, unter denen die Hefe gezüchtet war. So ist die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe stark abhängig von der Zusammensetzung der Nährlösung, in der die Hefe gezüchtet war. Von besonderer Bedeutung ist der Stickstoff- sowie Wuchsstoffgehalt der Nährlösung. Je ärmer an Wuchsstoff die Nährlösung ist, desto größer ist die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe. Hefe von einer wuchsstoffarmen Nährlösung konnte eine viermal so große Senkungsgeschwindigkeit haben wie Hefe von einer wuchsstoffreichen Nährlösung.

Bei der erwähnten Untersuchung wurde Wuchsstoff in Form von Bierwürze zugesetzt. Hiermit wurden aber außer Wuchsstoff auch andere Stoffe der Nährlösung zugeführt, u. a. eine Reihe Stickstoffverbindungen. Da aber die erwähnte Untersuchung gezeigt hat, daß gerade die Stickstoffverbindungen der Nährlösungen große Bedeutung für die Senkungsgeschwindigkeit haben, so bestand die Möglichkeit, daß die mit der Bierwürze zugeführten Stickstoffverbindungen, und nicht der Wuchsstoff, die Senkungsgeschwindigkeit herabsetzten. Eine sichere Entscheidung, daß es wirklich der mit der Bierwürze zugeführte Wuchsstoff ist, der die Senkungsgeschwindigkeit beeinflußt, kann nur dadurch erreicht werden, daß man untersucht, welche Wirkung der Zusatz einer Reihe verschiedener Wuchsstoffpräparate auf die

Senkungsgeschwindigkeit der Hefe hat. Sofern die angewandten Wuchsstoffpräparate einen großen Unterschied in ihrem Stickstoffgehalt zeigen, aber doch die gleiche Wirkung auf die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe haben, so muß dieses als ein sicherer Beweis dafür angesehen werden, daß der Wuchsstoffzusatz die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe beeinflußt hat, nicht die mit den Wuchsstoffpräparaten zugeführten Stickstoffverbindungen.

Methodik.

Die angewandte Methodik ist in der erwähnten früheren Arbeit ausführlich beschrieben.

Die Hefe, deren Senkungsgeschwindigkeit untersucht werden sollte, wurde durch wiederholtes Aufschlemmen in destilliertem Wasser mit anschließendem Zentrifugieren gereinigt. Nach dem Reinigen wurde die Hefe in einer entsprechenden Menge destillierten Wassers aufgeschlemmt. Das Ausrühren der Hefe im Wasser muß sehr sorgfältig vor sich gehen, so daß sich keine Hefeklumpen in der Aufschlemmung finden, wodurch die Bestimmung der Senkungsgeschwindigkeit selbstverständlich ein falsches Ergebnis haben würde. Von dieser Hefeaufschlemmung entnahm man mit einer Pipette (mit ziemlich weiter Öffnung) 10 ccm. Diese wurden in ein gewogenes Wägeglas überpipettiert. Nach Trocknen zum konstanten Gewicht bei 105° wurde das Glas mit der Hefeaufschlemmung wieder gewogen und der Gehalt an Hefetrockensubstanz in den 10 ccm Aufschlemmung bestimmt. Von der Hefeaufschlemmung wurden 50 ccm in eine 50-ccm-Bürette überpipettiert. Diese Bürette hat einen Durchmesser von 1 cm und ist unten durch einen Glashahn mit weiter Bohrung geschlossen. Die Bürette verschmälert sich gleichmäßig am unteren Ende, so daß sich keine Terrassen bilden, wo die Hefe sich ablagern könnte. Die Bürette wird genau senkrecht an einem Stativ festgespannt. Es ist notwendig, daß diese Bedingungen erfüllt werden, damit die Bestimmung richtige Ergebnisse liefert. Nach Ablauf der gewünschten Versuchszeit (bei diesen Versuchen eine halbe Stunde) wurden die untersten 12,5 ccm abgelassen (d. h. das unterste Viertel). Der Hahn, der die Bürette unten schließt, wurde zuerst ziemlich weit geöffnet, damit die Hefeaufschlemmung schnell herausströmte, danach wurde er etwas und nach Ausströmen der 12,5 ccm ganz geschlossen. Von diesen 12,5 ccm pipettierte man 10 ccm in eine Wägeschale über und bestimmte die Trockensubstanz durch Trocknen bis zum konstanten Gewicht bei 105°. Bei beiden Entnahmen — bei Beginn und Abschluß des Versuchs — ist nach Möglichkeit die gleiche Pipette zu benutzen.

Die Senkungsgeschwindigkeit wird durch die prozentische Senkung je Minute ausgedrückt, d. h. die Menge Hefe, die je Minute von den obersten drei Vierteln der Hefeaufschlemmung in das unterste Viertel hinabsinkt, in Prozent derjenigen Hefemenge berechnet, die sich ursprünglich in den obersten drei Vierteln der 50 ccm Aufschlemmung befand. Diese Größe wird *SP* genannt. Nennt man a den Gehalt an mg Hefetrockensubstanz in 10 ccm bei Beginn des Versuchs, b den Gehalt an mg Hefetrockensubstanz in 10 ccm aus dem untersten Viertel bei

Abschluß des Versuchs und *t* die Versuchszeit in Minuten, so kann man *SP* nach folgender Formel finden:

$$SP = \frac{(b - a) . 100}{3 . a t}.$$

Versuchsergebnisse.

Zu den Versuchen wurde ausschließlich ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* benutzt, der gleiche Stamm, der auch bei Versuchen hier im Laboratorium angewandt wird. Er wurde in einer Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet: 0,7 g $MgSO_4$ — 1,0 g KH_2PO_4 — 0,4 g $CaCl_2$ — 0,5 g NaCl — 0,6 g Asparagin — 100 g Rohrzucker — $^1/_2$ ccm 1 %ige $FeCl_3$ je Liter. 500 ccm dieser Nährlösung wurden in 1 Liter-Stehkolben gegossen und nach Zusatz der gewünschten Menge Wuchsstoff durch Erwärmen auf 120° während 10 Minuten sterilisiert. Danach wurden sie mit Hefe geimpft und bei 20° stehengelassen. Nach Verlauf von 10 Tagen wurde die Hefe zu den Versuchen benutzt.

Als Stickstoffquelle wurde Asparagin verwendet, weil die vorausgegangene Untersuchung (*Nielsen*, 1937, S. 77) gezeigt hatte, daß die Hefe eine sehr große Senkungsgeschwindigkeit bekam, wenn man Asparagin als Stickstoffquelle benutzte. Aus praktischen Gründen war es am vorteilhaftesten, Hefe mit einer großen Senkungsgeschwindigkeit zu untersuchen. Als Wuchsstoffpraparate wurden Bierwürze, „Aspergillin" und Hefeextrakt benutzt. Die Bierwürze war Pilsnerwürze (10,7 % Balling), Aspergillin war durch Züchtung von *Aspergillus niger* auf synthetischer Nährlösung hergestellt. Nach 20 Tagen wurde die Nährlösung abfiltriert und autoklaviert. Der Hefeextrakt war hergestellt, indem man 100 g Preßhefe mit 1 Liter destilliertem Wasser 15 Minuten lang kochte. Von den drei Wuchsstoffpräparaten wurde der Gesamtstickstoff bestimmt. Bierwürze enthielt je 10 ccm 6,7 mg Stickstoff, Aspergillin 42,0 mg Stickstoff und Hefeextrakt 5,0 mg Stickstoff. Die drei Präparate enthielten also sehr verschiedene Stickstoffmengen.

Es wurden vier Versuchsreihen angestellt. In den beiden ersten wurde die Wirkung von Aspergillin und Bierwürze, in den beiden letzten die Wirkung von Hefeextrakt und Bierwürze untersucht. Es wurden verschiedene Mengen Bierwürze zugesetzt, so daß der Gehalt der Nährlösung an Bierwürze von $^1/_8$ bis 5 % schwankte. Von den beiden anderen Wuchsstoffpräparaten wurden wechselnde Mengen zugesetzt. Durch vorausgegangene Untersuchungen wurde ihre Wuchsstoffwirkung im Verhältnis zu der der Bierwürze bestimmt. Die Wuchsstoffwirkung des Hefeextraktes betrug nur ein Drittel von der der Bierwürze, und

es wurden deshalb dreimal so große Mengen zugesetzt. Die Wuchsstoffwirkung des Aspergillin betrug nur ein Viertel von der der Bierwürze, und es wurden deshalb viermal so große Mengen Aspergillin wie Bierwürze zugesetzt.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen I und II zusammengestellt.

Tabelle I. Bierwürze oder Aspergillin als Wuchsstoffquelle. Senkungszeit 30 Minuten.

Zusatz	Anfangswert	Schlußwert	SP	Zusatz	Anfangswert	Schlußwert	SP
$^1/_8$ % Bierwürze	20,4	64,9	2,42	$^1/_2$ % Aspergillin	58,9	139,6	1,52
$^1/_4$ % "	63,2	134,8	1,26	1 % "	64,6	112,2	0,82
$^1/_2$ % "	65,6	94,1	0,48	2 % "	54,1	84,2	0,62
1 % "	59,2	81,4	0,42	4 % "	55,2	74,6	0,39
2 % "	62,8	70,1	0,13	8 % "	59,2	74,4	0,29
5 % "	59,1	62,2	0,06	20 % "	55,6	66,2	0,21

Tabelle II. Bierwürze oder Hefeextrakt als Wuchsstoffquelle. Senkungszeit 30 Minuten.

Zusatz	Anfangswert	Schlußwert	SP	Zusatz	Anfangswert	Schlußwert	SP
$^1/_8$ % Bierwurze	49,5	151,2	2,28	$^3/_8$ % Hefeextrakt	30,8	78,0	1,70
$^1/_4$ % "	55,0	114,9	1,21	$^3/_4$ % "	59,0	126,4	1,27
$^1/_2$ % "	63,1	98,4	0,62	$1^1/_2$ % "	48,9	88,1	0,89
1 % "	59,4	79,7	0,38	3 % "	62,8	97,8	0,62
2 % "	67,7	74,6	0,11	6 % "	63,0	94,2	0,55
5 % "	63,8	67,1	0,06	15 % "	87,6	111,6	0,30

Alle vier Versuchsreihen haben deutlich gezeigt, daß ein Zusatz von Wuchsstoff die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe herabsetzt. Bei einem ganz geringen Wuchsstoffzusatz ist die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe sehr groß, etwa $SP = 2$; mit steigendem Wuchsstoffzusatz sinkt die Senkungsgeschwindigkeit ziemlich gleichmäßig. Bei Zusatz von 5 % Bierwürze ist sie auf 0,06 gesunken, also 40 mal geringer als bei Zusatz von $^1/_8$ % Bierwürze. Mit Aspergillin und Hefeextrakt sinkt die Senkungsgeschwindigkeit nicht so stark. Bei Zusatz von Aspergillin sinkt sie von 1,52 auf 0,21, also auf ein Siebentel, bei Zusatz von Hefeextrakt sinkt sie von 1,70 auf 0,30, also auf ein Sechstel. Da die zugesetzten Mengen an Aspergillin und Hefeextrakt mit Hinblick auf ihre Wuchsstoffwirkung den zugesetzten Mengen an Bierwürze entsprachen, so mußte man erwarten, daß die Veränderungen in der Senkungsgeschwindigkeit bei Zusatz von steigenden Mengen gleichblieben. Dieses ist nicht der Fall. Mit steigenden Bierwürzemengen fällt die Senkungsgeschwindigkeit viel stärker als mit steigenden Mengen

Aspergillin oder Hefeextrakt. Dieses beruht vermutlich darauf, daß auch die zusammen mit dem Wuchsstoff zugeführten Stickstoffverbindungen die Senkungsgeschwindigkeit beeinflußt haben. Es kann aber auch auf Unterschieden zwischen dem Wuchsstoffgehalt der drei Wuchsstoffpräparate beruhen.

In einer neuen Versuchsreihe wurde die Senkungsgeschwindigkeit bei Hefe untersucht, die mit einem noch geringeren Zusatz an Wuchsstoff gezüchtet war, als dies bei den vorhergehenden Versuchen der Fall war. Als Wuchsstoffquelle wurde Bierwürze benutzt. Während der Zusatz an Bierwürze bei den vorhergehenden Versuchen von $^1/_8$ bis 5 % schwankte, wechselte der Zusatz an Bierwürze bei dem neuen Versuch von $^1/_{64}$ bis 1 % Bierwürze. Die Hefe war ebenso wie bei den vorhergehenden Versuchen 10 Tage alt, als man ihre Senkungsgeschwindigkeit bestimmte. Die Ergebnisse zeigt Tabelle III.

Tabelle III. Die Senkungsgeschwindigkeit bei ganz kleinen Würzemengen.
Senkungszeit 30 Minuten.

Zusatz	Anfangswert	Schlußwert	*SP*	Zusatz	Anfangswert	Schlußwert	*SP*
$^1/_{64}$ % Bierwürze	32,0	89,9	2,01	$^1/_8$ % Bierwürze	43,1	119,8	1,98
$^1/_{32}$ % „	48,8	134,2	1,94	$^1/_4$ % „	51,7	106,6	1,18
$^1/_{16}$ % „	41,7	112,5	1,89	1 % „	50,0	72,4	0,50

Dieser Versuch bekräftigt die Ergebnisse der vorausgegangenen, denn die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe ändert sich sehr stark, je nachdem die Hefe mit viel oder wenig Wuchsstoff gezüchtet war. Ferner geht aus dem Versuch hervor, daß die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe nicht weiter steigt, sofern der Zusatz an Bierwürze weniger als $^1/_8$ % beträgt, sondern ungefähr konstant bleibt (*SP* etwa = 2). Das beruht wahrscheinlich darauf, daß Hefe, die mit Zusatz von $^1/_8$ % Bierwürze gezüchtet war, bereits so wuchsstoffarm wie nur möglich geworden ist. Vermindert man den Wuchsstoffzusatz weiter, so wird die Hefe deshalb nicht wuchsstoffärmer werden, sondern es wird sich nur weniger Hefe bilden. Daß die Hefe eine Minimalgrenze für ihren Wuchsstoffgehalt hat, ist früher nachgewiesen worden (*Nielsen* 1935).

Die hier mitgeteilten Versuche haben also eindeutig gezeigt, daß die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe in sehr hohem Grade von dem Wuchsstoffgehalt der Hefe abhängig ist. Je wuchsstoffärmer die Hefe wird, desto größer wird ihre Senkungsgeschwindigkeit. Daß wirklich der Wuchsstoffgehalt der angewandten Präparate und nicht andere Stoffe diese Wirkung ausüben, geht aus der deutlichen Parallelität zwischen dem Wuchsstoffgehalt der angewandten Präparate und ihrer Wirkung auf die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe hervor. Die Abweichungen, die sich zwischen der Wirkung der Bierwürze und der von

Aspergillin und Hefeextrakt finden, sind nur gering und können wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, daß ihr Gehalt an anderen Stoffen, z. B. an Stickstoffverbindungen, sehr verschieden ist.

Dieser Einfluß des Wuchsstoffes ist dadurch besonders interessant, daß er nicht auf eine direkte Einwirkung auf das Wachstum zurückgeführt werden kann. Zufuhr von Wuchsstoff zur Hefe wird ja ein stärkeres Wachstum und als Folge hiervon die Anwesenheit vieler junger Hefezellen bewirken. Nun haben aber andere Versuche gezeigt (*Nielsen*, 1937, S. 73, 76, 79), daß junge Hefe eine größere Senkungsgeschwindigkeit hat als ältere Hefe. Da die Zufuhr von Wuchsstoff eine Herabsetzung der Senkungsgeschwindigkeit bewirkt, so kann diese Wirkung nicht dem vermehrten Wachstum zugeschrieben werden. Der Wuchsstoff muß deshalb auf eine andere Weise auf die Hefe wirken. Die angewandte Methode gestattet keine Entscheidung, was die Ursache der großen Senkungsgeschwindigkeit ist, sie kann an dem höheren spezifischen Gewicht, an der Zunahme der Größe der Hefezellen und an einer stärkeren Flockung liegen. Wahrscheinlich ist das letztgenannte Verhalten — eine starke Flockung — die Ursache der großen Senkungsgeschwindigkeit; die wuchsstoffarme Hefe zeigt in wässeriger Aufschlemmung große Klumpen. Wahrscheinlich bildet sich in der Hefe bei Mangel an Wuchsstoff ein Klebemittel, das nicht gebildet wird, wenn die Hefe wuchsstoffreicher wird.

Zusammenfassung.

Die Senkungsgeschwindigkeit bei *Saccharomyces cerevisiae*, d. h. die Menge Hefe, die je Minute in einer Hefeaufschlemmung in destilliertem Wasser zu Boden sinkt, ist in hohem Grade von dem Wuchsstoffgehalt der Hefe abhängig. Die Hefe wurde in einer synthetischen, wuchsstofffreien Nährlösung gezüchtet, zu der man steigende Mengen verschiedener Wuchsstoffpräparate, nämlich Bierwürze, Aspergillin und Hefeextrakt, zusetzte. Diese drei Wuchsstoffpräparate hatten die gleiche Wirkung auf die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe, so daß es ihr Gehalt an Wuchsstoff und nicht ihr Gehalt an anderen Stoffen sein muß, der die Senkungsgeschwindigkeit beeinflußt hat. Je mehr Wuchsstoff der Nährlösung zugesetzt wird, desto geringer wird die Senkungsgeschwindigkeit der Hefe. Eine wuchsstoffarme Hefe besitzt also eine große, eine wuchsstoffreiche Hefe nur eine kleine Senkungsgeschwindigkeit. Der Unterschied ist sehr beträchtlich, denn die Senkungsgeschwindigkeit der wuchsstoffarmen Hefe kann bis 40 mal so groß sein wie die der wuchsstoffreichen Hefe.

Literatur.

N. Nielsen, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. 21, 151, 1935. — *Derselbe*, ebenda 22, 61, 1937.

(Aus dem Erbwissenschaftlichen Forschungsinstitut des Reichsgesundheitsamtes in Berlin-Dahlem.)

Cytologische Untersuchungen an Paratyphus- und Colibakterien.

Von

Gerhard Piekarski.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. September 1937.)

Eines der Ziele cytologischer Untersuchungen an Bakterien ist die Klärung der Frage, ob Bakterien ebenso wie andere Organismen Zellkerne besitzen oder diesen homologe Gebilde, die als morphologische Grundlage für erbbiologische Vorgänge angesprochen werden könnten. Auf Anregung des Herrn Prof. Dr. *W. Seiffert* bin ich dieser Frage nachgegangen.

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit, deren Veroffentlichung durch äußere Gründe verzögert wurde, erschien in dieser Zeitschrift eine Arbeit von *B. Stille* (1937), der zu den gleichen Ergebnissen kommt, wie ich sie am anderen Objekt ebenfalls beobachten konnte. Aus diesem Grunde habe ich das Manuskript meiner Arbeit erneut durchgearbeitet und an entsprechenden Stellen die Arbeitsergebnisse von *B. Stille* berücksichtigt[1].

Bei der Frage nach dem Kern der Bakterien handelt es sich darum, einen Körper aufzufinden, der sich mit dem Kern der ein- und mehrzelligen Tiere und Pflanzen homologisieren läßt. Die einzigen Mittel, die wir dazu in der Hand haben, sind Färbungen und eine echte mikrochemische Reaktion. Genetische Methoden sind wegen der fehlenden Sexualvorgänge bei Bakterien nicht anwendbar.

Bei den verschiedenen Untersuchungen der früheren Autoren wurden meistens Farbstoffe gewählt, die in der histologischen und cytologischen Forschung als Kernfarbstoffe gebräuchlich — und auch erprobt — waren, es zum Teil auch noch sind. Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* wurde neben *Romanowsky-Giemsa*-Farbgemisch und Methylgrün als „chromatinspezifisch" angesehen. Außerdem kamen die Bakterienfarbstoffe in verschiedensten Variationen und Zusammenstellungen zur Anwendung, und die Körner, die man dann in den Zellen zu sehen bekam, wurden als Kerne ausgegeben. *A. Meyer* (1912) macht sich in seinem Büchlein über die Zelle der Bakterien die Mühe, die Fehldeutungen richtig zu stellen, obgleich er selbst in Ermangelung eines spezifischen Kernfärbemittels sicher auch nicht immer die richtige Deutung gefunden hat.

[1] Bei der Abfassung der Arbeit haben mir die Herren Prof. Dr. *G. Just* und Dr. *H. Bauer* wertvolle Hinweise gegeben, für die ich ihnen bestens danken möchte.

Anders liegen die Verhältnisse seit der Entdeckung der Nuclealreaktion nach *Feulgen*, die eine chemische Definition erlaubt. Bei dieser Färbung handelt es sich um den mikroskopisch-chemischen Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure, wie sie sich als regelmäßiger Bestandteil der chromatischen Substanz tierischer und pflanzlicher Zellkerne findet.

Was berechtigt uns, der fuchsinschwefligen Säure beim Suchen nach Kernen oder gleichwertigen morphologischen Gebilden eine solche Bedeutung beizumessen? Die bisherigen Erfahrungen haben gezeigt, daß die Kerne und besonders die Chromosomen durchgehends eine Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure enthalten, und daß diese, nach vorheriger Hydrolyse mit normaler Salzsäure, mit fuchsinschwefliger Säure die bekannte *Feulgen*-Reaktion gibt. Außer einigen ganz wenigen Spezialfällen besitzt diese Reaktion für die Tiere und Pflanzen eine gewisse Allgemeingültigkeit [vgl. die Arbeiten von *Feulgen* (1932), *H. Bauer* (1932), *Milovidov* (1936)]. Vor Augen halten muß man sich dabei aber stets, daß eine positive Nucleal-*Feulgen*-Reaktion zunächst stets nur den Nachweis für das Vorhandensein von Thymonucleinsäure bedeutet. Erst in zweiter Linie darf man — sofern bestimmte biologisch-physiologische Bedingungen erfüllt sind (verstanden wird darunter vor allem die Fähigkeit der Teilung des gefärbten Körpers vor der Zellteilung) — die *Feulgen*-positiven Zellbestandteile als Kernsubstanz ansprechen. Aber selbst dann, wenn diese Bedingungen erfüllt sind, ist die Identität mit Kernsubstanz kein zwingender Schluß. In den Blepharoplasten der Trypanosomen findet man nämlich Gebilde, die die oben angegebenen Bedingungen erfüllen und doch nicht Kernnatur besitzen, also nicht als genetisch wesentlicher Zellbestandteil anzusprechen sind [*Bresslau* und *Scremin* (1924)].

Man sollte glauben, daß es mit der mikrochemischen Untersuchungsmethode gelingen müßte, den Bakterienkern — sofern er den gleichen Chemismus wie die Zellkerne der Protisten und Metazoen besitzt — aufzufinden. In der Tat hat sich nachweisen lassen, daß die Bakterien Thymonucleinsäure[1] enthalten und eine positive Nuclealreaktion geben. Dennoch hat sich bisher kein eindeutiger Nachweis für die Existenz eines dem Kern der höheren Tiere und Pflanzen gleich zu setzenden Gebildes erbringen lassen, und die Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten ließen noch mehrere Deutungen zu, die im einzelnen schon öfter aufgezählt worden sind, so daß mir ein Hinweis auf die Arbeiten genügend erscheint [*K. Pietschmann* (1931), *Milovidov* (1935), *Stille* (1937)].

Auffallend war jedoch eine bemerkenswerte Übereinstimmung, die bis vor kurzem für diejenigen Befunde bestand, die sich auf die

---

[1] Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei betont, daß unter Thymonucleinsäure stets die an Eiweißkörper gebundene (Nucleoproteide) und nicht die freie Säure (Volutin) verstanden wird. Siehe auch *Reichenow* 1928.

sporenbildenden Bazillen beziehen. Für 1. *Bac. mycoides*, 2. *B. megaterium*, 3. *B. anthracoides*, 4. *B. subtilis* wurde nämlich von *Pietschmann* und *Rippel* (1), *Petter* (1 u. 2), *Milovidov* (1, 2, 3 u. 4), *Voit* (4) einheitlich beobachtet, daß die sporenbildenden Bazillen eine diffuse Nuclealreaktion geben. Zur Zeit der Sporenbildung kondensiert sich die nuclealpositive Substanz, um (nach *Pietschmann* und *Rippel* nur zum Teil) in die Spore einzugehen.

Alle diese zunächst einheitlich erscheinenden Befunde sind nun allerdings soeben von *B. Stille* (1937) berichtigt worden. Er konnte nachweisen, daß die diffuse Nuclealreaktion nur durch die Hydrolyse bei + 60° C zustande kam. Er fand dagegen bei weniger starker Hydrolyse bei + 40° C schon in den vegetativen Zellen lokalisierte Thymonucleinsäure, und zwar in der gleichen Anordnung, wie ich sie (siehe weiter unten) bei den nichtsporenbildenden Bakterien beobachten konnte. Jede vegetative Zelle von *Bac. megaterium*, *B. mesentericus fuscus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. Ellenbachensis*, *B. robur* und *B. ruminatus* beherbergt im Innern zwei *Feulgen*-positive Gebilde, die sich teilen. Bei der Sporenbildung geht einer von den beiden Körpern in die Spore ein, der andere geht zugrunde. Bei der Deutung seiner Befunde läßt *Stille* aber die Frage, ob die gefundenen Zelleinschlüsse als Kerne angesprochen werden dürfen, offen. „Es spricht", wie er schreibt, „vieles für ihre Kernnatur. Es kommen jedoch eine ganze Reihe von Möglichkeiten hinzu, die zur Vorsicht in der Deutung mahnen und jedenfalls eine endgültige Entscheidung noch nicht ermöglichen". Ein endgültiges Urteil, ob wir in den Nuclealkörpern Kerne sehen dürfen, ist erst möglich, „wenn weitere Objekte und Kriterien für eine Kernnatur beigebracht und mögliche Fehlerquellen ausgeschaltet sind".

Fast einheitliche Befunde zeitigten die Untersuchungen an *Sarcinen*. *Petter* (2) bekam bei *Sarcina gigantea*, die sie aus einem Hering isolierte, eine echte Nuclealreaktion an einem Körper, den sie als Kern anspricht. Dieser teilt sich nach ihrer Angabe amitotisch und verhält sich chemisch und färberisch wie ein echter Zellkern. Die zweite Mitteilung über *Sarcina lutea* machte *Milovidov* (1). Er entscheidet aber nicht, „ob die ganze *Sarcina*-Zelle oder nur die zentral liegenden Körperchen die Reaktion geben; man kann nur gefärbte Pünktchen beobachten. Die Frage, ob diese Pünktchen mit den von anderen Autoren beschriebenen Pünktchen übereinstimmen, muß man deshalb dahingestellt sein lassen". Leider gibt *Milovidov* keine Abbildungen seiner *Sarcina*. Als zentralen Kern deutet auch *Sassuchin* einen nuclealpositiven Körper, den er bei *Sarcina flava* fand. *B. Stille* beschreibt bei Sarcinen „einen nuclealpositiven Bezirk", den er im Zellinnern beobachten konnte. *Delaporte*, die vor kurzem bei *Kokken* nach Kernen suchte, fand zentral gelegene

Kerne, die sie wiederum mit dem Zentralkörper der Blaualgen in Zusammenhang bringt.

Außer den genannten Bakteriengruppen wurden noch weitere Arten untersucht, ohne daß aber die Frage nach dem Kern der Bakterien eindeutig beantwortet werden konnte.

Voit (1, 2) fand „nur Kernstoffe im biochemischen Sinne“; er will damit sagen: Thymonucleinsaure, wie sie bei den hoheren Organismen stets anzutreffen ist (siehe auch *Imsenecki*). – Nach *Thomas* (1, 2) kann bei *B. Calmetti* das Chromatin in Bakterienprotoplasten diffus verteilt sein oder in Korner, die sich durch Einschnurung teilen, kondensiert werden. Als Kernsubstanz sprechen *Epstein, Ravich-Birger* und *Svinkina* (1, 2) *Feulgen*-positive Korper in *Tuberkelbakterien* an, die sie vorher mit Schwefelkohlenstoff entfetteten. – – Ebenfalls *Feulgen*-positive Gebilde beschreibt *Delaporte* (2) in *Spirillum praeclarum* (aus dem Darm der Kaulquappe von *Alytes obstetricans*); dieses Bakterium enthalt einen Achsenfaden, der mit Eisenhamatoxylin sowie nach *Feulgen* gut farbbar ist. Bei der Sporenbildung wird der Achsenfaden gleichsam in die entstehende Spore aufgenommen. Ist die Spore reif, dann besitzt die ubrigbleibende Zelle keine *Feulgen*-positiven Substanzen mehr. Es wird abzuwarten sein, ob sich ahnliche Befunde wiederholen. – Auf zwei Arbeiten uber *B. pestis* soll erst nach Mitteilung der eigenen Befunde eingegangen werden (S. 437).

Nach den bisherigen Arbeitsergebnissen darf das Vorhandensein von Thymonucleinsaure in den Zellen der Bakterien als völlig gesichert gelten. Ebenso ist wohl kein Zweifel daruber, daß die Thymonucleinsäure auch lokalisiert in Gestalt von kleinen Kornern in Bakterienzellen und Sporen angetroffen werden kann. Wenn *Pietschmann* schreibt, daß genetisch betrachtet, die Thymonucleinsäure „doch nicht das Wesentliche, kaum Gensubstanz“ sein kann, so ist dazu zu sagen, daß wir – wie auch *Pietschmann* (allerdings mit einem Fragezeichen) bemerkt – nach den bisherigen Erfahrungen „in der Thymonucleinsaure einen standigen Begleitstoff von Gensubstanz“ vor uns haben. Lassen sich daher nuclealpositive Gebilde feststellen, die sich durch ihre Nuclealreaktion scharf vom ubrigen Zellinhalt unterscheiden und sich regelmäßig vor jeder Zellteilung auch teilen, dann darf man wohl – ohne die Tatsache der nuclealpositiven Blepharoplasten außer acht zu lassen – immerhin als nicht unwahrscheinlich ansehen, daß wir *Strukturen von kernahnlicher Bedeutung* vor uns haben.

Eigene Untersuchungen.

Material und Technik.

Als Untersuchungsobjekt diente in erster Linie der nichtsporenbildende *Paratyphus B-Bacillus, Stamm* V_2. Dann wurde noch der *Stamm 88* von *Bac. Coli* gepruft. Sie wurden auf gewöhnlichem Bakterienagar, auf synthetischen Nährböden und in Bouillon gezüchtet und stets bei 37° C im Brutschrank gehalten. Es sei aber schon an dieser

Stelle betont, daß eine *Abwandlung der Nährbodenverhältnisse durchaus keinen Einfluß auf die Arbeitsergebnisse hatte.*

Die beiden benutzten synthetischen Nährböden hatten folgende Zusammensetzung:

I. Asparagin-Natrium 0,5 ‰, Natriumlactat 0,5 ‰, Kaliumbiphosphat 0,2 ‰, Magnesiumsulfat 0,02 ‰, Kochsalz 0,2 ‰, Agar 2,0 ‰.

II. wie I., nur wurde Natriumlactat durch Traubenzucker in gleicher Menge ersetzt.

Als Zuchtgefäße dienten die üblichen *Petri*-Schalen und Reagensrohrchen. Daneben kam die sogenannte „Nährbodenfilmmethode“, wie *K. Hu* diese Art der Bakterienbeobachtung nennt, zur Anwendung, um lebende Bakterien einzeln zu beobachten. Sie besteht darin, einen Nahrboden herzustellen, der so dünn ist, daß man die Bakterien noch durch den Nährboden hindurch mit der Ölimmersion beobachten kann (Einzelheiten der Technik siehe bei *J. Fortner*).

Die Bakterien wurden entweder als Klatschpräparate studiert oder mit einer Platinose von der Kolonie entnommen und auf Deckgläser ausgestrichen. Als Fixierungsmittel kam Essigsäure, Osmiumsaure, das Gemisch nach *Carnoy* oder Sublimatalkohol zur Anwendung. Die Fixierung über der Flamme wurde als zu grob bewußt vermieden.

Die Färbung geschah in erster Linie mit Carminessigsäure (C. E. S.).

Dieser Farbstoff macht eine vorherige Fixierung uberflüssig. Die Essigsaure fixiert -- wenigstens Kernstrukturen -- recht gut. Die C. E. S. hat in den letzten Jahren immer mehr ihre Brauchbarkeit für cytologische Untersuchungen erwiesen. Es sei nur an die Arbeiten von *E. Heitz* erinnert, dem ich die Bekanntschaft mit diesem Farbstoff verdanke. Auch die Untersuchungen an den Speicheldrüsenchromosomen der Dipteren haben die hohe Spezifitat der C. E. S. fur typische Kernsubstanz (Thymonucleinsaure) bewiesen und gezeigt, daß die Farberesultate mit der C. E. S. große Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Nuclealreaktion besitzen.

Die Anwendung geschieht in der folgenden Weise: Die frischen Klatschpräparate werden direkt auf einen Objektträger in einen Tropfen C. E. S. gelegt. Schon nach etwa einer Minute sind die Bakterien optimal durchgefärbt. Von der Anfertigung von Dauerpraparaten wurde bei dieser Färbemethode in den meisten Fallen abgesehen, weil sich der Farbton im Alkohol und Xylol verschlechterte.

Notwendig erscheint mir ein Hinweis zur Herstellung der C. E. S.

In einem kochenden Gemisch von 1 Teil Eisessig und 1 Teil destilliertem Wasser lost man soviel pulverisiertes Carmin, daß die filtrierte Losung *dunkelrot* erscheint.

Neben der C. E. S. wurde die Nuclealreaktion nach *Feulgen* ausgiebig verwendet.

Im allgemeinen ging die Anwendung so vor sich:

1. Fixierung (Art der Fixierung war ohne Einfluß auf das Farbeergebnis).
2. Abspulen in Aqua dest.
3. Hydrolyse etwa 10 Minuten in normaler Salzsäure bei 60° C.
4. Abspülen in Aqua dest.
5. Etwa 1 Stunde Färbung in fuchsinschwefliger Saure, die einen Überschuß an SO_2 enthielt.

6. Waschen in SO_2-Wasser (etwa 10 bis 15 Minuten zweimal wechseln).
7. Alkoholreihe-Xylol-Canadabalsam.

(Herstellung der fuchsinschwefligen Saure siehe bei *Feulgen* in *Abderhaldens* Handbuch und bei *v. Schuckmann*). Eine Verbesserung der Nuclealreaktion wurde durch die Abwandlung der fuchsinschwefligen Saure nach *Wermel* (Zusatz von Acetaldehyd und erneute Entfarbung durch SO_2) nicht erreicht.

Das Ergebnis der Färbung blieb das gleiche, wenn man auf die Fixierung verzichtete und die Klatschpraparate direkt für 10 Minuten in normale Salzsaure stellte, um die Hydrolyse vorzunehmen. Nicht hydrolysierte Praparate blieben ungefärbt. Sie wurden zur Kontrolle stets geprüft.

Die Photographien wurden mit dem „Panphot" der Firma *E. Leitz* angefertigt, einer auch mir zur Verfügung stehenden Leihgabe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Die Photographien sind samtlich mit einer $^1/_{12}$ Ölimmersion (95mal) und achtfachem Okular von *Leitz* aufgenommen. Dazu kam eine zusatzliche Vergroßerung der Bilder durch den Balgenauszug. Leider konnte die Vergrößerung nicht bei allen Photos einheitlich gehalten werden; doch liegt sie etwa zwischen 1200 und 1500mal.

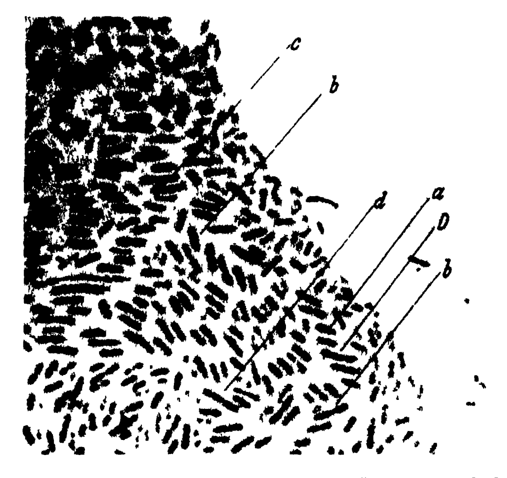


Abb. 1. *Paratyphusbazillen* PrimareForm Nuclealreaktion ohne Plasmagegenfarbung In den Zellen stets 2 (oder ein Mehrfaches davon) nuclealpositive Korper Die Pfeile weisen in alphabetischer Reihenfolge auf die Teilung der nuclealpositiven Korper hin D Zelle mit drei Nuclealkorpern; der eine ist offenbar dem anderen in der Teilung schon vorangegangen (Nur sehr selten zu finden)

Befunde.

Die cytologischen Untersuchungen erstreckten sich auf nichtsporenbildende Bazillen. Diese wurden gewahlt, um Verwechslungen von sich entwickelnden Sporen mit Kernstrukturen von vornherein auszuschalten. Grundsatzlich ließ sich dabei feststellen, daß *alle Arten und Stamme eine positive Nuclealreaktion* bei voraufgehender Hydrolyse zeigten Rein technisch wurde peinlichst darauf geachtet, Pseudoreaktionen durch freies Fuchsin, Plasmalogen- oder Volutinreaktionen zu verhindern, so daß die Strukturen, die sich mit der fuchsinschwefligen Saure darstellen ließen, nach unserem heutigen Wissen wohl sicher als an Eiweiß gebundene Thymonucleinsaure, wie wir sie in den echten Zellkernen finden, angesprochen werden durften.

Zur Untersuchung wurden die nicht sporenbildenden *Paratyphus-* und *Coli-Bazillen* gewählt. Diese treten uns in der üblichen Bouillonagarkultur in zwei verschiedenen Formen entgegen, die im folgenden als primär und sekundär bezeichnet werden. Die primären Zellen (Abb. 1,

2 und 5) erhalt man stets, wenn man eine frische Agarplatte mit lebensfähigen Keimen beimpft und nach drei- bis sechsstündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37⁰ untersucht[1]. Bleiben die beimpften Agarplatten langer im Brutschrank, dann treten unter Umstanden schon die sekun-

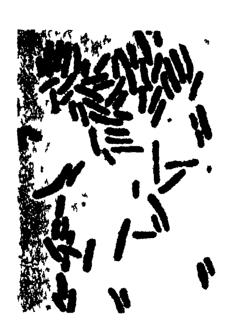


Abb 2 *Paratyphusbazillen* Primare Form Carminessigsaure ohne vorherige Hydrolyse

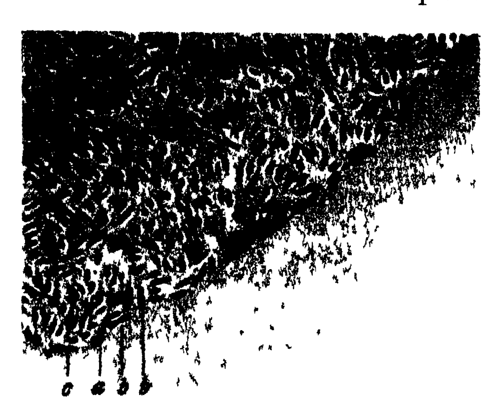


Abb. 3 *Paratyphusbazillen* Sekundare Form Nuclealreaktion ohne Plasmagegenfärbung In den Zellen stets ein zentral gelegener nuclealpositiver Korper. Zum Teil in Teilung begriffen, charakteristische Teilungsstadien (a—c) sind durch Pfeile gekennzeichnet

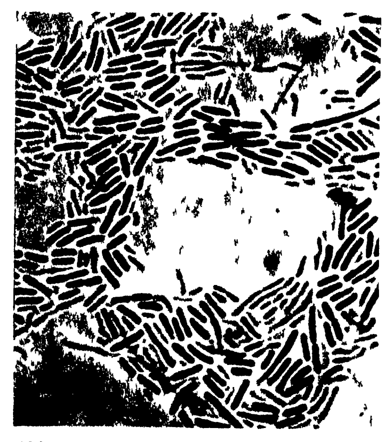


Abb 4 *Paratyphusbazillen* Primare und sekundare Bakterien nebeneinander mit Carminessigsaure gefarbt Einige Sekundarformen durch Pfeile gekennzeichnet Die ungefarbten Zellen ohne Inhaltskorper sind abgestorben Das Praparat wurde dadurch gewonnen, daß etwa 10 Tage altes Kulturmaterial auf eine frische Agarplatte geimpft und von den Impfstrichen nach 2 Stunden ein Klatschpraparat angefertigt wurde Einige Sekundärzellen haben sich schon in Primarzellen umgewandelt

daren Formen (Abb 3 und 4) auf, indessen hangt das Auftreten von Sekundarformen anscheinend von der Masse der angesammelten Stoffwechselprodukte ab, ist also abhangig von der Masse der aufgeimpften Bakterien und der Menge des Nahrmediums Es scheint das folgende Verhaltnis zu bestehen, fur das experimentelle Grundlagen gefunden wurden Je mehr Bakterien aufgeimpft werden, und je niedriger der Agar gegossen wird, desto fruher treten die sekundaren Formen auf. Sie konnen sehr lange am Leben bleiben Ihre Lebensfahigkeit hangt ab von der vorhandenen Feuchtigkeit Auf frischen Nahrboden gebracht, wachsen sie zu primaren Formen heran

[1] Diese Zeiten gelten fur einen bestimmten Paratyphusstamm und haben keine allgemeine Gultigkeit, sondern sind bei jedem Stamm verschieden.

Die beiden Formen, die primäre und die sekundäre, lassen sich cytologisch klar unterscheiden (vgl. Abb. 1 bis 6). Beide geben einwandfreie Nuclealreaktionen an morphologisch scharf umgrenzten Körpern. Die primäre Form enthält *zwei* nuclealpositive Körper, die nahe den beiden Polen des Stäbchens liegen (Abb. 1, 5 und 6), die sekundare Form dagegen besitzt nur *einen* zentral gelegenen Körper (Abb. 3 und 4). Dieser läßt sich im Gegensatz zu den Gebilden der Primärform auch mit der hier zum ersten Male bei cytologischen Untersuchungen von Bakterien benutzten Carminessigsäure (C. E. S.) leicht sichtbar machen (siehe auch unsere Abb. bei *W. Seiffert*, S. 526). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Formen besteht hinsichtlich der Färbbarkeit des Zelleibes mit C. E. S. Die primären Zellen nehmen das Carmin stark auf, die sekundären Formen werden dagegen nur schwach gefärbt (Abb. 2 und 4). Die primären Zellen erscheinen dann zwar nicht absolut homogen, aber man kann auch keine definierbaren Strukturen erkennen. Anders wird das Bild, wenn man die primäre Form der Bakterien etwa 5 Minuten der Hydrolyse durch normale Salzsaure bei 60° C aussetzt. Färbt man nun, nachdem die Präparate in destilliertem Wasser ausgewaschen wurden, dann sieht man ganz klar die gleichen Strukturen, die uns auch die Nuclealreaktion offenbart. Das gleiche Bild ergibt sich bei Hydrolyse und nachträglicher Färbung mit Giemsafarbstoff (Abb. 5). Die Frage ist jetzt: wie wirkt die Hydrolyse vor der Färbung mit C. E. S.?



Abb. 5. *Paratyphusbazillen.* Primäre Form. Giemsafärbung mit vorheriger Hydrolyse (vgl. mit Abb. 1).

Große Wahrscheinlichkeit hat nach meiner Ansicht die Annahme fur sich, daß die Membran der Bakterienzelle, die erst kurzlich von *Wamoscher* gerade fur die *Paratyphus-Coli*-Gruppe als sicher vorhanden beschrieben wurde, und die wahrscheinlich aus einem sehr „resistenten" Gel besteht, durch die Hydrolyse für die Carminessigsäure durchlässig gemacht wird und so die Färbung *der* Korper ermöglicht, die sich auch mit der Nuclealreaktion darstellen lassen. Die zweite Möglichkeit, die Wirkung der Hydrolyse zu erklären, bestande in der Annahme, daß die gefarbten Gebilde keine Primärstrukturen, sondern Kunstprodukte darstellen, die unter dem Einfluß der Hydrolyse entstanden sind. Dagegen spricht aber die Tatsache, daß die Strukturen auch *ohne* Hydrolyse mit der *Giemsa*-Farbung und der Eosindifferenzierung (Methode *Badian*) dargestellt werden können (Abb. 7, vergl. auch S. 437). Ferner spricht die Konstanz der Zahl, Lage und Gestalt gegen die Auffassung als Kunstprodukte: Jede primäre Paratyphuszelle enthält stets zwei nahe den Zellenden gelegene Körper.

Auch *B. Stille* fand keinen Hinweis dafür, die gefundenen Strukturen als Kunstprodukte anzusprechen. Äußere Einflüsse vermochten die Gebilde, die sich *Feulgen*-positiv verhielten, nicht zu beeinflussen. Eine Veränderung der Nährbodenzusammensetzung blieb ebenso ohne Einfluß wie eine Änderung der Temperatur oder H-Ionenkonzentration. Ich kann diese Befunde, soweit sie sich auf die Nährbodenzusammensetzung und die Temperatur beziehen, für meine Bakterienarten vollkommen bestätigen (vgl. oben S. 432).

Was die *Feulgen*-positiven Einschlüsse bemerkenswert macht, ist die Tatsache, daß sie sich vor der Zellteilung teilen (Abb. 1, 3—6). Die primären Bazillen wachsen in beiden Richtungen ihrer Längsachse. Mit

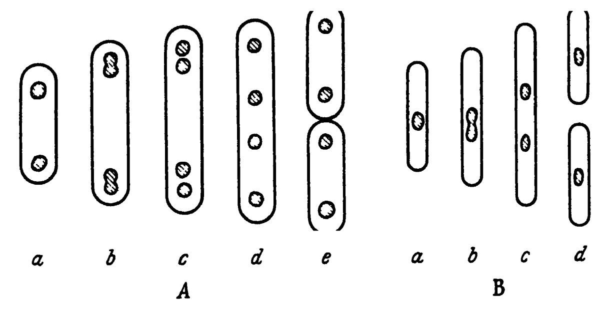


Abb 6 A und B A Schema des Teilungsvorganges der Nuclealkorper bei der primaren Form des *Paratyphusbazillus* B Dasselbe bei der sekundaren Form

Beginn der Langsstreckung werden auch die Nuclealkorper langlich und teilen sich. Im Laufe des weiteren Längenwachstums der Zelle wandern die beiden neu entstandenen inneren Teilprodukte gegen die Mitte der Zelle, und zwischen ihnen teilt sich dann der Zelleib, so daß schließlich die beiden neuen Zellen wieder zwei nuclealpositive Korper, je einen in der Nähe der Zellenden, tragen. Neben den Teilungsbildern in der Photographie spricht auch *die* Beobachtung für eine Teilung der Nuclealkörper, daß die Lange *der* Zellen, deren Nuclealkörper rund sind, im Mittel geringer ist als die der Zellen, deren Nuclealkörper länglich erscheint. Deren Zellänge wieder ist geringer als die der Bakterien, deren Nuclealkörper sich gerade geteilt hat:

Die Mittelwerte waren (gemessen an den Photographien, vgl. auch Abb. 6 A):

a) 2,5 mm ohne Anzeichen der beginnenden Teilung, b) 3,6 mm längliche Form, c) 4,4 mm gerade geteilt, d) 5,8 geteilt und getrennt.

Die Sekundärform enthält nur *einen* *Feulgen*-positiven Körper, der sich offenbar auch vor jeder Zellteilung halbiert (Abb. 6 B und 3).

Ganz unspezifisch in ihrer Färbung sind die üblichen Bakterienfarbstoffe wie Methylenblau, Carbolfuchsin, Gentianaviolett u. a.

Eine Ausnahme davon macht scheinbar auch das *Giemsa*-Farbgemisch nicht; die Zellen werden fast einheitlich blau gefärbt, ohne klare erkennbare Strukturen. Anders aber wird der Färbeeffekt, wenn man statt der üblichen Differenzierung mit Aceton eine etwa 1 %ige wässerige Eosinlösung benutzt. (Diese Methode, die leider in ihrer Wirkung nicht übersehen werden kann, stammt von *Badian*, der sie auch bei Bakterienkern-Untersuchungen benutzte.) Bei dieser Methode der *Giemsa*-Färbung differenzierten sich in den Zellen zwei nahe den Enden der Zellpole gelegene Körper heraus, die sich, wie man aus dem Präparat bzw. der Abb. 7 erschließen kann, als teilungsfähig erweisen. Da sie auch an der gleichen Stelle liegen wie die thymonucleinsaure-haltigen Körper, die mit der Nuclealreaktion nachgewiesen werden konnten, bin ich der Überzeugung, daß beide Strukturen identisch sind. Wenn die Größenverhältnisse voneinander etwas abweichen, so erklart sich das wohl dadurch, daß der *Giemsa*-Farbstoff auch das Substrat färbt, das die Thymonucleinsaure trägt.



Abb. 7. *Paratyphusbazillen*. Primare Form. Giemsafarbung mit Eosindifferenzierung. Teilung der Korper in den Zellen.

Die gleichen Verhaltnisse liegen nun anscheinend auch fur den Sporenbildner *Bacillus subtilis* vor. *B. Stille* fand in dessen vegetativen Formen die beiden schon erwähnten Nuclealkörper in der Nähe der Zellenden. Und *Badian* beschreibt auf Grund seiner Untersuchungen mit Hilfe der *Giemsa*-Farbung und Eosindifferenzierung ganz ahnliche Einschlußkörper, die er z. B. in Abb. 2 (S. 412) seiner Arbeit wiedergibt.

An dieser Stelle will ich kurz auf die Befunde an *Bacillus pestis* eingehen. *Pokrowskaja* (1931) beobachtete, daß in den zunachst aus gewohnlichen bakteriellen Formen bestehenden Pestbazillenkolonien nach einigen Tagen auf dem Nahragar Formen „mit deutlicher morphologischer Differenzierung von Kern und Protoplasma" auftreten, und bemerkt dazu, daß es *keine* absterbenden Formen sind, sondern daß sie sich bei Überimpfung auf neues Agar sehr bald in normale Stabchen verwandeln. Nach diesen Angaben zu schließen, stimmen die Verhaltnisse beim Pestbazillus anscheinend überein mit den Befunden bei *Bacillus paratyphi* und *coli*. Die als kernhaltig beschriebenen Formen würden den Sekundarformen entsprechen. Über die primare Zellform wird leider nur mitgeteilt, daß sie auch eine positive Nuclealreaktion gibt, also auch Nucleoproteide enthalt. Die Befunde von *Pokrowskaja* wurden von *Sassuchin* bestatigt.

Folgerungen aus den Untersuchungsergebnissen.

Wie sind diese cytologischen Befunde zu deuten? Zunächst steht fest, daß wir in den untersuchten Bakterien durchgehend einen spezifi-

schen Bestandteil der Kerne der höheren Tiere und Pflanzen feststellen konnten. Diese spezifische Kernsubstanz, die Thymonucleinsäure, ließ sich an Zelleinschlüssen nachweisen, die sich offenbar regelmäßig vor jeder Zelldurchschnürung auch teilten und in jeder neuen Zelle an bestimmten Stellen stets anzutreffen waren.

Fassen wir diese Beobachtungen mit den Ergebnissen *Stille*s zusammen, dann ergibt sich folgendes Bild:

Sporenbildende wie nicht sporenbildende Bazillen enthalten als primäre Formen — das sind die vegetativen Stäbchen — Thymonucleinsäure, die in zwei Körpern lokalisiert ist, die sich vor jeder Zellteilung teilen. Bei den Sporenbildnern geht eins von den beiden Gebilden in die Spore ein. Bei den nichtsporenbildenden Bazillen verschmelzen zur Zeit der Entstehung der Sekundärform entweder die beiden Körper zu einem zentralen Gebilde, das sein Teilungsvermögen noch weiterhin beibehält, aber schließlich zugrunde geht, oder — die zweite Möglichkeit — die primäre Zelle teilt sich in zwei Zellen, die dann je einen der beiden nuclealpositiven Körper enthalten (Abb. 8). Ein sicherer Nachweis für die eine oder andere Möglichkeit ließ sich noch nicht erbringen.

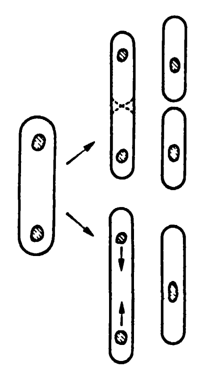


Abb. 8 Schematische Darstellung der Entstehung der Sekundärform aus der Primärform; die beiden Möglichkeiten (s. Text hierneben)

Wie ist nun an Hand dieser Ergebnisse die Frage nach dem Kern der Bakterien zu beantworten? — Gesichert erscheint mir -- zumal auch die Befunde von *B. Stille* vorliegen , daß wir in den Nuclealkörpern der untersuchten Bakterien *Primärstrukturen und keine Artefakte* vor uns haben. Ihr Vorkommen ist gesetzmäßig, und sie teilen sich offenbar vor jeder Zellteilung. Obwohl nun die Substanz, die mit der *Feulgen*-Reaktion nachzuweisen ist, — mit der einzigen Ausnahme des Blepharoplasten bei einigen Flagellaten — bisher nur im Zellkern nachgewiesen ist, ginge man zu weit, wenn man diese Körper bereits jetzt als Kerne bezeichnen wollte, zumal ein Nachweis von Chromosomen bisher in keinem Falle gelungen ist. Auch *B. Stille* ist bei der Deutung der nuclealpositiven Körper sehr zurückhaltend und äußert sich wohl noch vorsichtiger (vgl. diese Arbeit S. 430).

Ich halte es für zweckmäßig, eine eigene Bezeichnung für diese „Kernsubstanzkörper“ zu haben, um sie von Zellkernen und von den sogenannten Polkörpern (z. B. bei Diphtheriebazillen) zu unterscheiden. Mir erscheint die Bezeichnung „*Nucleoid*“[1] vorläufig geeignet, um die

[1] nucleus = Kern, εἶδος = ähnlich.

kernähnlichen Eigenschaften und das kernähnliche Verhalten der Gebilde, die Teilungsfähigkeit der Körper und den Gehalt an Thymonucleinsäure, zum Ausdruck zu bringen. Es soll damit einer späteren endgültigen Entscheidung über die Natur der Nucleoide nicht vorgegriffen werden.

Zusammenfassung.

In den Zellen des *Paratyphus*- und *Coli*-Bazillus gelingt es, morphologisch klar umgrenzte Körper nachzuweisen, die sich biologisch und chemisch wie Zellkerne verhalten. Die primären Formen enthalten *zwei*, die sekundären *einen* zentral gelegenen Körper. Die Körper sind regelmäßig vorhanden, teilen sich offenbar vor jeder Zellteilung und enthalten *Feulgen*-positive Substanzen. Sie werden als „*Nucleoide*" (= *kernähnliche* Körper) bezeichnet.

Literatur.

Ausführliche Literaturangaben finden sich in den Arbeiten von *A. Meyer*, *K. Pietschmann* und *P. F. Milovidov* (1935).

J. Badian, diese Zeitschr. 4, 409, 1933. — *H. Bauer*, Zeitschr. f. Zellforsch. 15, 225, 1932. — *E. Bresslau* u. *L. Scremin*, Arch. f. Protistenkde. 48, 509, 1924. — *B. Delaporte*, (1): C. r. Acad. Sci. Paris 201, 1409, 1935; (2): ebenda 202, 1382, 1936; (3): ebenda 203, 199, 1936. — *G. W. Epstein*, *E. D. Ravich-Birger* u. *A. A. Svinkina*, (1): Biol. Zeitschr. 4, 309, engl. Zusammenfassung (Russisch 1935); (2): Giorn. Batter. 16, 1, 1936. — *R. Feulgen*, Die Nuclealfärbung. Abderhaldens Handbuch d. biolog. Arbeitsmethoden. Abt. V., 2, 1055, 1932. — *J. Fortner*, Neuere Methoden in der Bakteriologie, Naturwiss. 23, 699, 1935. — *E. Heitz*, Chromosomenstruktur und Gene (mit ausführlicher Literaturangabe). Zeitschr. indukt. Abstammungslehre 70, 402, 1935. — *K. Hu*, The Journal of the Chosen Medical Association 25, 29, 1935. — *A. Imsenecki*, Centralbl. f. Bakt. II, 94, 330, 1936. — *Arthur Meyer*, Die Zelle der Bakterien, Jena (Fischer) 1912. — *P. F. Milovidov*, (1): diese Zeitschr. 6, 475, 1935; (2): Protoplasma (Berlin) 25, 570, 1936. — *H. F. M. Petter*, (1): C. r. Acad. Sci. Paris 197, 88, 1933; (2): Ann. Inst. Past. 51, 742, 1933. — *K. Pietschmann*, diese Zeitschr. 2, 310, 1931. — *K. Pietschmann* u. *A. Rippel*, ebenda 3, 422, 1932. — *M. Pokrowskaja*, Centralbl. f. Bakt. I, 119, 353, 1931. — *Ed. Reichenow*, Arch. f. Protistenkde. 61, 144, 1928. — *D. Sassuchin*, ebenda 84, 186, 1935. — *W. v. Schuckmann*, Arbeiten a. d. RGA., Berlin-Dahlem 57, 801, 1926. — *W. Seiffert*, Reichsges.-Bl. H. 27, S. 524, 1936. — *B. Stille*, diese Zeitschr. 8, 125—148, 1937. — *A. Thomas*, (1): C. r. Soc. Biol. Paris 105, 859, 1930; (2): Arch. zool. expér. et gen. 72, 417, 1932. — *Kurt Voit*, (1): Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 47, 183, 1925; (2): ebenda 55, 564, 1927. — *L. Wamoscher*, Zeitschr. f. Hyg. 111, 422, 1930. — *E. Wermel*, Zeitschr. f. Zellforschg. 5, 400, 1927.

(Contribution from the Departments of Agricultural Bacteriology and Agricultural Chemistry, University of Wisconsin, U. S. A.)

Mechanism of symbiotic nitrogen fixation.

III. Hydrogen as a specific inhibitor[1].

By

P. W. Wilson and W. W. Umbreit.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 2. September 1937.)

In previous reports (6, 7) was discussed the special advantages of a physical-chemical approach to the problem of characterization of the enzyme system responsible for the fixation of atmospheric nitrogen through association of the root nodule bacteria (*Rhizobium sp.*) and the *Leguminosae*. In the initial paper (6) the influence of the p_{N_2} in the atmosphere on the fixation process in red clover inoculated with *Rh. trifolii* was detailed. During the course of the experiments described in that paper, it was observed that if the p_{O_2} of an atmosphere supplied to the plants was maintained constant (0.2 atm.), the p_{N_2} could be lowered to about 0.1 atm. without descrease in the total nitrogen fixed, provided that the nitrogen gas removed from the atmosphere was either unreplaced (plants grown in partial vacuum) or replaced with argon or helium. If hydrogen gas, however, was used to replace the nitrogen removed from a normal atmosphere, there occurred a definite decrease in the quantity of nitrogen fixed. This result suggested that hydrogen does not behave as an inert gas under these circumstances but may be a specific inhibitor for the symbiotic nitrogen fixation process.

If such a finding can be established, it will have important consequences not only because of its intrinsic value in defining certain properties of the enzyme system concerned in symbiotic nitrogen fixation but also because it will provide a new tool for future research on the mechanism of this biological process. It is necessary, therefore, that the evidence of this effect of hydrogen be carefully examined in order to insure correct interpretations of the experimental results. It is of especial interest and importance to provide answers to the following questions:

(a) Is the effect of hydrogen specific for the nitrogen fixation process, or is it merely an effect on the general development of the

[1] *Herman Frasch* Foundation in Agricultural Chemistry, Paper No. 142.

plant? To answer this question, it is necessary to demonstrate that the uptake of combined nitrogen by red clover is not affected, or at least is affected in a manner quantitatively distinct from that observed in plants which use elemental nitrogen. If the effect of hydrogen is concerned only with the general growth of the plant (independent of the source of nitrogen), the finding would be of interest from the point of view of plant physiology but would have no especial significance for the nitrogen fixation problem.

(b) Is the effect due to hydrogen itself or to some impurity present in the gas used? The hydrogen employed in the majority of the experiments was a commercial electrolytic product of 99.5 per cent purity, the other 0.5 per cent being mainly oxygen. There remained the possibility, however, that the real inhibitor might be present in this hydrogen in minute quantities.

In this paper are given results of experiments extending over a period of five years concerned with the problem of the influence of hydrogen on symbiotic nitrogen fixation. Before considering these results it would be advantageous to discuss the types of experiments which might be used to secure answers to the two questions presented. The *total quantity* of nitrogen assimilated in definite periods of time by plants grown under atmospheres containing different partial pressures of hydrogen gas could be determined. This procedure is the usual one employed in physiological experiments. *Burk* (1) and *Werkman* (5) have pointed out dangers of misinterpretation of the data from this type of experiment in connection with growth of micro-organisms, since an apparently significant effect may be associated with only some particular stage or rate of growth of the organism under investigation. Inability to maintain the organisms under differing treatments in the same stage or at the same rate of growth may lead to erroneous conclusions. In order to eliminate these possibilities, kinetic studies involving measurements of the *rate* of formation (or disappearance) of some substance are advocated, *e. g.* rate of growth or rate of uptake of nitrogen. Experiments which measure *rates* are of particular value, if during the period of the test, the substance under investigation increases as a logarithmic function of time, *e. g.*, if the logarithm of nitrogen assimilated plotted against time results in a straight line. In this case the slope of the line possesses certain properties which make it very useful for comparing effects of treatment (1).

Although data from "*rate experiments*" may in many cases possess distinct advantages over those from "*total quantity experiments*", there are certain physical limitations which must be considered when designing experiments involving the growth of plants in controlled environments.

If the number of variables be only moderate (six to ten), then, even with the minimum of replication the number of plant cultures required in a given experiment soon approaches the limit set by expense of apparatus and suitable available space, to cite only a few of the factors which restrict plant experiments. Rate experiments rapidly multiply the total plant cultures required since several harvests (two at least) must be made of each treatment. With the number of cultures increased, an increase in the variation among replicates of the same treatment frequently occurs. The increase in variability is caused by the expansion in greenhouse space required so that random distribution of the replicates exposes them to differences in what are assumed to be the constant factors in the environment. For example, if the effect of p_{H_2} in the atmosphere is under investigation, temperature and light are assumed to be identical within reasonable limits for all the treatments; this is usually untrue if the size of the experiment requires that the cultures be distributed over a large area of the greenhouse. In such a case much of the advantage of replication (decreasing error of experiment) may be lost.

Considering the advantages and disadvantages of each kind of experiment, it appeared that the "total quantity" type might be more satisfactory for the required investigations, especially if certain precautions were observed. These necessary precautions would include: (a) daily observations of the plants to determine whether the effects noted appeared to be associated with any particular stage of development; (b) maintenance of reasonably equal growth rates in plants of different treatments, (c) repetition of the experiments during different seasons in order to vary rate and extent of growth, (d) change in the duration of the experiments; (e) replication of different treatments as much as is consistent with the available space of uniform environment; (f) statistical analysis of the data in order to separate effects due to treatment from those due to experimental error.

Experiments presented in this report are of the "total quantity" type; they have been conducted during different seasons of the year and have been terminated after varying periods of time. The total quantity of nitrogen assimilated by inoculated air controls has varied from 4 to 35 mg per 10 plants; by plants given combined nitrogen, 3 to 60 mg. The duration of the experiments has varied from 26 to 75 days; time under the atmospheres containing hydrogen, 9 to 35 days. The data concerned with the specificity of the hydrogen effect have been statistically analyzed; those which deal with the question of impurity in the hydrogen did not require this treatment. In a forthcoming publication additional data from rate experiments will be discussed.

Part I. The specificity of the hydrogen effect for symbiotic nitrogen fixation.

Methods.

Red clover plants (*Trifolium pratense*) were grown on a nitrogen-poor pit sand substrate supplied with nitrogen-free *Crone*'s solution. One series of plants was inoculated with an efficient strain of *Rh. trifolii*, and another was uninoculated but furnished combined nitrogen, usually as NH_4NO_3. The combined nitrogen was added periodically at such a rate that the development of the uninoculated plants was reasonably close to that of the inoculated plants kept in air. All cultures of the combined nitrogen series received the same quantity of nitrogen at each addition (3 to 7 days) independent of the treatment. The different atmospheres which constituted the sole variable in the treatment were supplied the plants by two methods, the "dynamic" and the "static". The "dynamic" method consisted of supplying gas mixtures *continuously* to the plants which were grown in 64 oz. (2 liter) flint glass bottles. All measurements of quantity of each gas needed for an atmosphere of a given composition were made with flowmeters (8). The "static" method, which was used in the majority of the experiments, involved growing the plants in 9 liter pyrex pressure bottles in which an atmosphere of a desired composition was readily prepared by withdrawing a portion of the air and adding cylinder gases. Use of this larger container allowed much greater development of the plants, and since the atmospheres were changed only every three days, the system was much more economical with respect to gases required.

In the majority of the experiments, the gases were passed through a simple purification chain of $NaOH$, alkaline $KMnO_4$, H_2SO_4, sterile distilled water and a cotton filter (see Part II, p. 454, for discussion of other purification methods). In each experiment seedlings were planted, one-half of the cultures inoculated, and all kept in air until the first signs of nitrogen fixation were apparent in the plants of the inoculated series. Usually it was necessary to add one or two milligrams of NH_4NO_3-N to the plants of the combined nitrogen series to keep them at the same level of growth as the inoculated plants. Duplicate cultures were harvested for "initial nitrogen content" and the remaining plants placed under atmospheres of different p_{N_2} and p_{H_2} (p_{O_2} kept constant in each experiment at 0.1 or 0.2 atm.). After varying periods of time, the final harvest was made, and dry weights and total nitrogen determined. When necessary, correction for inorganic nitrogen present was applied to the total nitrogen figures. Details of the methods used are given in other publications (6, 8).

The nature of the inhibition observed in inoculated red clover plants grown in the presence of hydrogen is indicated in figure 1. The left hand portion of this figure illustrates the decrease in quantity of nitrogen fixed as the p_{N_2} is decreased *if the nitrogen gas removed is replaced with hydrogen*. The "dynamic" method of supplying the gas mixtures was used in these experiments, and both agar and sand substrates were employed (9). The right hand portion of the figure shows a composite of a large number of experiments in which the nitrogen removed was either unreplaced or replaced with argon or helium (6). The difference in the response is quite marked. In the absence of hydrogen there is no evidence of decrease in the quantity of nitrogen

fixed as the p_{N_2} is lowered until the latter reaches about 0.1 atm. In the presence of hydrogen, however, the *total quantity* fixed is a straight line function of the p_{N_2} (likewise p_{H_2}) throughout the range of partial pressures investigated. Note that the deviations of the points from a straight line which passes through the origin are quite small.

The *dry weight* formed is likewise a linear function of the p_{N_2} of the atmosphere in the presence of hydrogen as is the *percentage of nitrogen* in the plant. This latter point is of interest since it definitely indicates that the effect of the hydrogen is on the nitrogen assimilation mechanism of the plant and not on the general growth. The decrease in the percentage nitrogen in the plants can be easily detected by the appearance of the cultures soon after they are placed in atmospheres containing hydrogen. Within three to seven days the leaves begin to turn yellow and the stem to redden; these are the usual signs of carbohydrate excess, *i. e.*, restriction of supply of nitrogen. These evidences of limited assimilation of nitrogen become even more pronounced with time so that there is no difficulty in separating inoculated cultures grown under atmospheres of different p_{H_2}. On the other hand, no such separation is possible among uninoculated cultures supplied with combined nitrogen since with minor variations, which were independent of the treatment, all become dark green in color and thrifty in general appearance. These observations suggest that the effect of hydrogen is specific for the nitrogen fixation process. Further experiments were undertaken in order to verify or reject this hypothesis.

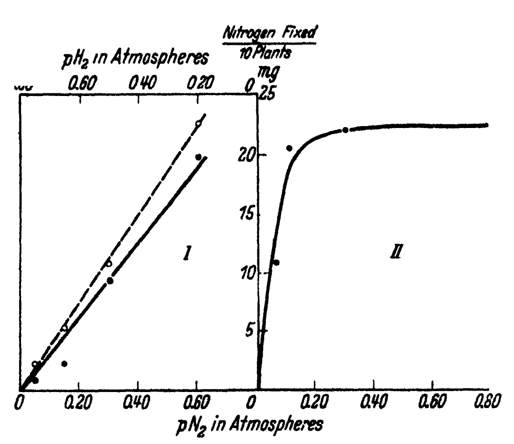


Fig. 1. Effect of pN_2 in atmosphere on nitrogen fixation by inoculated red clover plants in presence and absence of hydrogen.

pO_2 = 0.2 atm.

I — hydrogen added to one atm

II — He, Ar or no gas added. Composite of experiments described in reference (6).

○— —○ Agar substrate. ●——● Sand substrate

As the preliminary experiments had indicated that the total quantity of nitrogen fixed was a linear function of the p_{H_2} in the atmosphere, advantage was taken of this observation to test whether or not the nature of the response to the presence of hydrogen was associated with the source of nitrogen. Two series of clover plant cultures were grown under four atmospheres in which the p_{N_2} and p_{H_2} was varied. The p_{O_2}

was kept constant usually at 0.2 atm., in a few experiments at 0.1 atm. In one series the plants were inoculated, in the other not inoculated, but supplied with NH_4NO_3. The data from such experiments were treated statistically to determine the slope of the linear function between the p_{H_2} of the atmosphere and the *total quantity* of nitrogen fixed and between p_{H_2} and *percentage nitrogen* in the plants. Tests were then made to determine if the slopes of the lines for the plants of the inoculated series differ significantly from those for plants supplied with combined nitrogen. If differences can be established, they indicate that the response to hydrogen is associated with the source of nitrogen. Such a finding constitutes evidence that hydrogen inhibition is specific for the symbiotic nitrogen fixation process.

A second attack on the problem of specificity of the inhibition by hydrogen was made by reducing the number of atmospheres used; more replicates of a given treatment could then be taken. Data from such experiments were subjected to an analysis of variance, which established the significance of differences due to treatment. If the uptake of nitrogen by plants using the free element is inhibited to a significantly greater extent than is that of plants using the combined forms, this fact will constitute additional evidence that hydrogen is a specific inhibitor of the symbiotic nitrogen fixation process. Ten experiments were made, the details of which are summarized in Table I; in Tables II and III are compiled the essential data used in the statistical analyses.

Table I. Protocol of treatment of the various experiments.

Experiment	Date of planting	Date of harvest	Time under hydrogen days	N at start* mg	Number of plants for analysis	Combined nitrogen added per 10 plants mg
I	Mar. 8, 1933	Apr. 17, 1933	25	1.48	60	25
II	Oct. 19, 1933	Dec. 11, 1933	31	2.25	20	51
III	Sept. 12, 1934	Nov. 2, 1934	27	2.50	40	42
IV	Dec. 22, 1934	Feb. 11, 1935	24	2.00	40–50	25
V	Apr. 14, 1935	June 11, 1935	32	1.10	30–50	25
VI	Feb. 15, 1936	Mar. 13, 1936	9	1.68	40	—
VII	Mar. 8, 1936	Apr. 17, 1936	21	2.08	60	30
VIII	Sept. 12, 1936	Oct. 14, 1936	16	1.52	60	5
IX	Oct. 19, 1936	Dec. 21, 1936	35	1.44	40–60	30
X	Apr. 22, 1937	July 6, 1937	35	2.32	60	115

* At time placed under gas mixtures containing hydrogen.

Experiment I in 32 oz. bottles; 10 plants to bottle. Experiments IV and V in 64 oz. bottles; 10 plants to bottle. Remaining experiments in 9 Liter pressure bottle; 20 plants to bottle.

Data in all the tables on 10-plant basis.

Table II. Influence of p_{H_2} in atmosphere on assimilation of free and combined nitrogen. Data for regression function.

Experiment	p_{H_2} Atm	Inoculated series: Tatal N* mg	Inoculated series: % N	Combined nitrogen series: Total N* mg	Combined nitrogen series: % N
I	0.20	8.08	2.71	11.42	2.76
	0.50	5.02	2.23	13.67	2.68
	0.65	1.71	1.93	12.42	2.50
	0.75	1.18	1.50	8.52	2.38
II	0.0	33,85	2.54	40.25	2.85
	0.50	11.48	1.99	30.35	2.67
	0.65	5.58	1.35	34.75	2.53
	0.75	4.19	1.17	30.35	2.31
III	0.0	22.6	2.21	24.1	3.13
	0.40	10.4	2.00	20.8	3.00
	0.60	5.7	1.62	21.2	2.53
	0.73	4.4	1.35	23.7	3.45
IV	0.0	11.4	2.21	17.2	3.31
	0.40	6.4	2.00	18.3	3.50
	0.60	3.2	1.40	13.3	2.35
	0.70	1.76	1.14	16.0	2.71
V	0.0	4.68	1.75	8.96	5.54
	0.40	1.92	1.67	11.50	4.34
	0.60	1.37	1.46	8.14	5.11
	0.70	1.28	1.59	6.90	5.00

* Corrected for nitrogen present when placed under atmospheres.

Table III Influence of p_{H_2} in atmosphere on assimilation of free and combined nitrogen. Data for analyses of variance.

Experiment	Source of nitrogen	Total nitrogen, p_{H_2} in atmosphere: 0.0	Total nitrogen: 0.40—0.50	Total nitrogen: 0.60 0.65	Percentage nitrogen, p_{H_2} in atmosphere: 0.0	Percentage nitrogen: 0.40—0.50	Percentage nitrogen: 0.60—0.65
		mg	mg	mg			
VI	Inoc.	4.27	3.08	0.41	1.93	1.52	0.81
		3.75	2.50	0.31	1.78	1.32	0.93
VII	Inoc.	27.7	18.0	7.7	2.40	1.65	1.14
		23.7	12.1	7.1	2.33	1.43	1.14
		24.6	12.9	10.5	2.38	1.45	1.42
	NH_4NO_3	29.8	23.4	26.8	1.45	1.30	1.41
		26.4	30.4	19.6	1.64	1.25	1.37
		28.5	29.4	27.3	1.95	1.61	1.61
VIII	NH_4NO_3	4.00	3.15	2.88	2.08	1.46	1.69
		3.27	2.98	2.85	1.56	1.70	1.47
		2.88	2.52	2.48	1.47	1.67	1.40
IX	Inoc.	33.60	8.4	4.5	2.65	1.82	1.52
		36.50	10.4	4.8	2.57	2.00	1.63
	NH_4NO_3	22.6		22.5	1.60		1.45
		25.0		21.8	2.39		1.50
		28.0		30.9	2.27		2.58

Experiment	Source of nitrogen	Total nitrogen			Percentage nitrogen		
		p_{H_2} in atmosphere			p_{H_2} in atmosphere		
		0.0	0.40—0.50	0.60—0.65	0.0	0.40—0.50	0.60—0.65
		mg	mg	mg			
X	Inoc.	35.0	19.3	9.3	2.56	1.97	1.48
	$(NH_4)_2HPO_4$	52.2	54.0	50.9	2.65	2.27	2.86
		56.9	50.7	55.6	2.95	2.08	2.34
		57.0	52.2	51.6	2.65	2.33	2.34
		48.2	52.5	63.6	3.49	2.91	2.65
	$Ca(NO_3)_2$	47.9	44.1	32.6	2.69	2.38	2.38
		30.6	55.6	42.0	2.35	2.11	2.42
		40.6	49.1	58.7	2.66	2.22	2.34
		38.0	42.0	53.5	2.17	2.47	2.44

Statistical treatment of the data.

Lines of regression.

From the data given in Table II were determined the lines of regression of *total nitrogen* assimilated and of *percentage nitrogen* in the plant on the p_{H_2} of the atmosphere. Such lines have the usual linear form: $Y = a + bx$, in which Y represents the dependent variable, *e. g.*, nitrogen fixed; x is the independent variable, *e. g.*, p_{H_2}; and a and b are constants. Calculation of these constants a, the intercept on the y-axis, and b, the slope of the line, is made from the experimental data by use of the following equations.

$$a = \bar{y} - b\bar{x}, \tag{1}$$

$$b = \frac{\Sigma (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\Sigma (x - \bar{x})^2} = \frac{\Sigma y (x - \bar{x})}{\Sigma (x - \bar{x})^2}. \tag{2}$$

In the data under consideration $x = p_{H_2}$ in atm.; $\bar{x}$ = the mean of all x's used in a given experiment; y = milligrams of nitrogen assimilated (or percentage nitrogen in plant); $\bar{y}$ = the corresponding mean of either of these y's. The first question to be answered is: do the values of b calculated from the experimental data differ significantly from zero? That is, could the observed values of b have arisen by chance (experimental error)? If the values of b for both the inoculated and combined nitrogen series differ significantly from zero, then tests must be made to determine if they differ significantly from each other.

A suitable test for the significance of b is the analysis of variance applied to regression functions. In this test two variances are calculated and compared with one another as follows:

The first variance, that due to the regression function, is equal to the sum of the squares of the deviations of points on the observed *line of regression* from the line $Y = \bar{y}$, *i. e.*, a line with zero slope. These deviations between

the two lines are taken at the points corresponding to the values of x used in the experiment. This sum of squares has only one degree of freedom since its value for any given distribution of y depends only on the single statistic, b. For calculation, use is made of the following relationship:

$$\Sigma (Y - \bar{y})^2 = b \Sigma y (x - \bar{x}) = b^2 \Sigma (x - \bar{x})^2. \qquad (3)$$

The second variance ,that due to deviations from the regression function, is equal to the sum of the squares of deviations of the observed values of y from corresponding values of Y on the line of regression. For the calculation, use is made of the following equation:

$$\Sigma (y - Y)^2 = \Sigma (y - \bar{y})^2 - \Sigma (Y - \bar{y})^2. \qquad (4)$$

The first sum of squares in the right hand member of this equation is readily calculated from the original data, and the second sum is that obtained from equation (3). $\Sigma (y - Y)^2$ has $n - 2$ degrees of freedom where n equals the number of experimental points determined.

The variances corresponding to these sums of squares are obtained by dividing each by the appropriate number of degrees of freedom. From these variances,

$$F = \frac{\text{Variance due to regression}}{\text{Variance due to deviations from regression}}$$

is calculated; tables are available which indicate the significance of the value of F obtained (4). A significant value of F means that the observed value of b is significantly different from zero; *i. e.*, y changes with x. However, if the value of F obtained does not reach the level of significance, the observed value of b could have arisen through experimental error. Details of these tests are given in standard texts on statistics (2, 3).

The values required for the analyses of variance of the lines of regression are summarized in Table IV. In the *inoculated series* the values of b range from -0.05 to -0.41, the negative sign indicating that nitrogen fixation decreases with increase in the p_{H_2} of the atmosphere. In each of the five experiments the observed value of b differs significantly from zero. That is, there exists a relationship between fixation of free nitrogen and the p_{H_2} in the atmosphere such that decrease in the former is accompanied by an increase in the latter. The values of b for percentage nitrogen in the plant range from -0.003 to -0.021 and are significant except in one experiment. On the other hand, in the *combined nitrogen* series the values of b are much lower than the corresponding values in the inoculated series, and *in not a single case* is there evidence that the calculated value of b differs significantly from zero. This means that, on the basis of the individual experiments, the quantity of *combined* nitrogen assimilated is independent of the p_{H_2} in the atmosphere.

Consideration of the tests used to determine significance of the regression coefficients shows that if the estimation of b is based on only a few experimental points, errors of the experiment must be kept very low, else a small but definite regression will be masked. Replicate

Table IV. Significance of regression of nitrogen assimilation and of percentage nitrogen in plants on the p_{H_2} of the atmosphere.

Experiment	Variable	Inoculated series				Combined nitrogen series			
		$-b_{yx}$	$\Sigma(Y_1-\bar{y}_1)^2$	$(\Sigma y_1-Y_1)^2$	F	$-b_{yx}$	$\Sigma(Y_2-\bar{y}_2)^2$	$\Sigma(y_2-Y_2)^2$	F
I	Total N	0.132	30.07	0.73	82^{++}	0.034	1.97	12.47	0.3^{-}
	% N	0.021	1.493	0.036	79^{++}	0.007	0.078	0.012	13.3^{-}
II	Total N	0.411	561.5	3.77	298^{++}	0.118	46.52	19.73	4.8^{-}
	% N	0.018	1.078	0.100	21.5^{+}	0.006	0.131	0.025	10.5^{-}
III	Total N	0.258	202.2	4.18	97^{++}	0.016	0.81	7.76	0.2^{-}
	% N	0.011	0.396	0.047	17.3^{+}	0.000	0.00	0.437	0.0^{-}
IV	Total N	0.138	54.57	0.18	606^{++}	0.036	3.76	10.10	0.7^{-}
	% N	0.017	0.823	0.029	56^{+}	0.012	0.397	0.452	1.7^{-}
V	Total N	0.050	7.26	0.45	32^{+}	0.027	2.08	7.01	0.6^{-}
	% N	0.003	0.030	0.016	3.6^{-}	0.007	0.131	0.609	0.4^{-}
Combined	Total N	0.211	855.6	9.31	188^{++}	0.05	45.15	57.07	1.6^{-}
	% N	0.014	3.209	0.229	27.9^{++}	0.006	0.736	1.534	1.0^{-}

y_1 = mg N fixed per 10 plants; y_2 = percentage nitrogen in plants; Y = points on regression line; b_{yx} = regression coefficient of y on x, the minus sign indicating a negative correlation between the two variables. For definition of other symbols, see text.

For individual experiments, if F exceeds 18.5, the odds are at least 19 : 1 that observed value of b differs significantly from zero (indicated by +); if F exceeds 98.5 odds are 99 : 1 (indicated by ++); minus indicates b does not differ significantly from zero. For combined experiment the sum of $\Sigma(Y-\bar{y})^2$ is divided by 5 and that of $\Sigma(y-Y)^2$ by 10 before calculation of F; in this case the critical values of F are 3.33 (19 : 1 odds) and 5.64 (99 : 1) odds.

cultures of the series given combined nitrogen were inclined to be more variable than those of the inoculated series. This greater variation probably arises from two major differences: (a) The combined nitrogen is supplied *periodically* to the plants, and this apparently causes greater variation among the plants in a single bottle than is noted among similar plants which use free nitrogen *continuously*. (b) The development of the plants in the combined nitrogen series is greater than that of plants in the inoculated series, except for the inoculated plants kept in air. As will be shown in a later publication, the uptake of nitrogen during the period of growth represented in these experiments is reasonably close to logarithmic. Initial small differences arising from variability in seeds or from uncontrollable inequalities in the environment will, therefore, cause *absolute differences* among replicates to increase with the development of the plant. It follows that the greatest variation will be observed among those cultures which take up the greatest quantity of nitrogen.

Since in each of the experiments the observed value of b indicated a small negative regression of uptake of *combined nitrogen* on p_{H_2}, it was thought that the existence of such regression might be statistically established if more experimental points were available. In the individual experiments only four points were used which means that F is based on one and two degrees of freedom, and therefore must be quite high, 18.5, in order that the observed value of b may be held to be significant. By combining the data from the five experiments, it is possible to make a test for a significant b from twenty experimental points. In the combined data, F is based on 5 and 10 degrees of freedom and is required to reach a value of only 3.33 in order to indicate that the b for the common line is significantly different from zero.

Even with a combination of the experiments. however, there is no evidence of the existence of a significant regression of either assimilation of nitrogen or percentage nitrogen in the plant on the p_{H_2} of the atmosphere in the *combined nitrogen* series. As would be expected from the analyses of the individual experiments of the *inoculated series*, the plants of this series show a highly significant (99 : 1 odds) negative regression of both variables on p_{H_2}.

It is apparent from these statistical analyses that the response of red clover to the presence of hydrogen gas in the atmosphere is definitely associated with the source of nitrogen, which indicates that the effect is concerned with the nitrogen fixation process. Although the points in individual experiments of the combined nitrogen series might be fitted with some type of a non-linear regression function, inspection of the data suggests that no one function would apply to all of them, since the response to a given p_{H_2} in the atmosphere varied among experiments. Likewise, even if there does exist a non-linear regression

between uptake of combined nitrogen and p_{H_2}, the conclusion reached, *viz., plants using elemental nitrogen respond to the presence of hydrogen in a manner significantly different from that of plants using combined nitrogen*, would not be invalidated.

Analysis of variance of nitrogen assimilation and percentage nitrogen.

For the usual type of analysis of variance fewer treatments (p_{H_2}) than were used in the first five experiments are possible, but more replication is desirable in order to reduce the experimental error. The theory of the analysis of variance is: the total variance of any variable, *e. g.*, nitrogen fixed, can be divided into two or more portions including that due to treatment and that due to error. The magnitudes of these two are compared by calculating F = variance due to treatment divided by variance due to error, and the significance of F determined (3, 4). A significant F means that *at least one* treatment gave rise to a result which differs significantly from those of other treatments. As more than one treatment may be involved, further tests are made to determine which particular treatments were responsible for the significant *variance due to treatment.*

Analyses of variance were made on the data reported in Table III. In some of these experiments only duplicate samples were taken of the cultures of the inoculated series since previous experience indicated a small experimental error for these series. As has already been discussed, the experimental error for plants supplied combined nitrogen is usually considerably higher than that for inoculated plants so that at least triplicate cultures were made in the combined nitrogen series. In Experiment IX only 12 containers were available; therefore, duplicate cultures were made of three treatments in the inoculated series and triplicate cultures of two treatments in the combined nitrogen series. Experiment VIII was a short time test using combined nitrogen to correspond with Experiment VI which did not include a combined nitrogen series.

In all experiments except Experiment X combined nitrogen as NH_4NO_3 was added periodically at such a rate that the development of the plants in the combined nitrogen series did not exceed that of inoculated plants supplied with air. This practice was employed in order to maintain the plants of the two series in the same stage of growth, except for differences due to presence of hydrogen. The question might be raised whether the necessarily low level of combined nitrogen used might not have been a limiting factor for growth of the uninoculated plants, thus tending to mask the effect of hydrogen. Experiment X was designed to meet this objection. Since the primary interest was concerned with the effect of hydrogen on plants given combined

nitrogen, only a single bottle of each treatment was set up as the inoculated series. Two sources of combined nitrogen were used, $(NH_4)_2HPO_4$ and $Ca(NO_3)_2$ which were added at as high a level as the plants would tolerate; an excess of combined nitrogen was available at all times. As the area covered by the cultures in this experiment was considerably larger than that in the other tests, no attempt was made to compensate for difference in position in the greenhouse by frequent rotation of the plant containers (6). Instead the space required was divided into four blocks, and the treatments were randomized within each block.

The analyses summarized in Table V show that in every experiment the variance due to treatment (p_{H_2}) in the *inoculated series* was highly significant with respect both to nitrogen fixed and to percentage nitrogen in the plants. Further tests showed that this result arose from significant differences among all the three classifications of p_{H_2} used in these experiments; *i. e.* plants grown in an atmosphere with a p_{H_2} of 0.4 atm. had a significantly lower nitrogen content than plants grown in air and significantly higher than plants grown in an atmosphere with a p_{H_2} of 0.6 atm. In sharp contradistinction to these differences in the *inoculated series*, the observed differences among plants given *combined nitrogen* were all within experimental error.

Table V. Summary of analyses of variances.

Experiment	Treatment	Variance due to	D.F.	Nitrogen assimilated		% Nitrogen		Critical points *
				Variance	F	Variance	F	
VI	Inoc.	p_{H_2}	2	6.885	67.1++	0.4875	38.1++	9.55
		Error	3	0.102	—	0.0128	—	30.81
VII	Inoc.	p_{H_2}	2	220.7	14.55++	1.054	74.8++	5.14
		Error	6	15.17	—	0.0141	—	10.92
	NH_4NO_3	p_{H_2}	2	11.86	1.0−	0.6838	2.95−	5.14
		Error	6	12.12	—	0.2313	—	10.92
VIII	NH_4NO_3	p_{H_2}	2	0.441	3.42−	0.0252	0.5−	5.14
		Error	6	0.129	—	0.0502	—	10.92
IX	Inoc.	p_{H_2}	2	534.9	257++	0.5578	65.6++	9.55
		Error	3	2.08	—	0.0085		30.81
	NH_4NO_3	p_{H_2}	1	0.11	0.01	0.0889	0.3−	224.6
		Error	4	66.47	—	0.2944	—	5625.0
X	$(NH_4)_2HPO_4$	p_{H_2}	2	9.485	0.4−	0.3077	4.64−	5.14
		Block	3	8.353	0.1−	0.2170	3.27−	10.92
		Error	6	25.178	—	0.0664	—	
	$Ca(NO_3)_2$	p_{H_2}	2	82.68	0.7−	0.0300	0.8−	19.3
		Block	3	33.39	0.3−	0.0192	0.5−	99.3
		Error	6	111.16		0.0358	—	

* The first value given is the 5% point for the degrees of freedom involved; the second, the 1% point. If F exceeds the 5% point the odds are at least 19:1 that the differences observed did not arise from chance (experimental error); if F exceeds value for 1% point, odds are 99:1.

Thus from a second type of experiment the same conclusion is reached as before: Hydrogen in the atmosphere restricts the assimilation of free nitrogen in proportion to the p_{H_2}, but there is no evidence that assimilation of combined nitrogen is similarly restricted. In Experiment X it is of interest that the experimental error (square root of the variance) is twice as large among those plants given $Ca(NO_3)_2$ as among those given $(NH_4)_2HPO_4$. Also, the variance due to *block* is subnormal, indicating that in this experiment position in the greenhouse was without significant effect.

Part II. Hydrogen as the specific agent.

The results discussed in Part I indicated that the addition of commercial electrolytic hydrogen to an atmosphere supplied inoculated red clover plants inhibited the nitrogen fixation process. The question still remained: is the inhibition due to hydrogen itself or to an accompanying impurity? Two distinct methods of attack were employed to answer this question: (a) the commercial source of hydrogen used in the experiments of Part I was purified in a variety of ways, then tested for inhibitory properties; (b) hydrogen from different sources was examined for effect on the fixation process.

In four experiments the plants were grown in 64 oz. (two liters) flint glass bottles, and the atmosphere supplied by means of the ,,static" method described in Part I. Duplicate culture bottles were connected with a glass T-tube joined to the inlet tubes of the rubber stoppers used to close the bottles. In one experiment 9-liter pyrex pressure bottles were used. After fixation had started (1.5 to 2.0 mg nitrogen per 10 plants), the atmospheres containing sources of hydrogen were introduced, and the effect on uptake of free nitrogen noted. These atmospheres containing hydrogen were of the following composition: $p_{O_2} = 0.2$, $p_{N_2} = 0.2$, $p_{H_2} = 0.6$ atm. These, as well as the normal air in the controls, were renewed weekly.

The different hydrogens used were prepared as follows:

I. Sources of hydrogen.

1. Electrolytically generated by commercial producer No. 1. Hydrogen used in experiments of Part I.
2. Electrolytically generated by commercial producer No. 2.
3. Chemically generated from Zn plus HCl.
4. Chemically generated from Al plus NaOH.
5. Chemically generated from Mg plus water slightly acidified with H_3PO_4.
6. Electrolytically generated in laboratory from dilute H_3PO_4 using Pt electrodes.

All of the hydrogens prepared in the laboratory were washed with dilute solutions of NaOH and H_3PO_4 and with distilled water. All chemicals used were of the C. P. analytical grade.

II. Purification of hydrogen.

1. Hydrogen was passed through a purification chain of alkaline $KMnO_4$ (oxides of nitrogen), conc. H_2SO_4 (unsaturated organic compounds), water, lead acetate (H_2S), Ag_2SO_4 (halogens), $CuCl(CO)$, and sterile distilled water.
2. Same as 1 plus two tubes each of $CaCl_2$ and activated norite (non-specific charcoal adsorption).
3. Hydrogen which had been exposed for 3 to 4 days to sunlight, to decompose any iron carbonyls present, was passed through $CuCl$ to remove any resulting CO.
4. Hydrogen was passed over activated charcoal at liquid air temperature[1].
5. Hydrogen from 4 was passed through following chain: heated at 600° C. in presence of CaO, Mg and finely divided Cu and Pt (organic compounds, metallic compounds); cooled to 30° C. and passed through $CuCl$, Br_2 water (unsaturated compounds and some alcohols), fuming H_2SO_4, conc. $H_2Cr_2O_7$ (oxidizable organic compounds), aq. KOH (acids), lead acetate, alkaline $KMnO_4$, acid $KMnO_4$, $Na_2S_2O_3(NO)$, $FeSO_4$, acid solutions of activated norite and of silica gel, alkaline solutions of activated norite and silica gel; then over alumina, $Ca(OH)_2$, copper oxide and permutite; dried with $CaCl_2$ and passed in dry state over silica gel, activated norite, kieselguhr, zeolite, alumina gel and permutite; and finally through four washings with distilled water.

Commercial hydrogen No. 1 was used with all of these purification chains since it was known to contain the active agent. Some of the impurities which would be removed by these treatments are indicated in the parentheses.

Five experiments were made as follows:

Experiment	Container	Planted	Harvested	Days under gases
XI	64 oz.	6/18/36	8/14/36	43
XII	9 liter	5/30/36	8/24/36	66
XIII	64 oz.	8/20/36	10/16/36	43
XIV	64 oz.	10/24/36	12/18/36	30
XV	64 oz.	9/ 7/36	10/28/36	28

From the experiments discussed in Part I, it is apparent that inoculated red clover plants grown in an atmosphere with a p_{H_2} of 0,6 atm. contain only 25 to 35 per cent of the total nitrogen found in plants grown in air (or in plants grown in an atmosphere with a p_{N_2} of 0,2 atm., but in which the nitrogen removed is either unreplaced or replaced with helium or argon). If, then, any of the methods of purification or of preparation eliminates all or part of the active agent, the inhibition as measured by the total nitrogen in the plants should be

[1] The authors express their appreciation to Prof. *J. R. Roebuck* of the Department of Physics, University of Wisconsin, for this purification.

less than 65 to 75 per cent. Consideration of the data from four experiments presented in figure 2 indicates that no agent other than hydrogen itself is implicated in the inhibition noted. Independent of the source or the method of purification used, the total nitrogen in the plants grown in the presence of a p_{H_2} of 0,6 atm. amounts to only 25 to 35 per cent

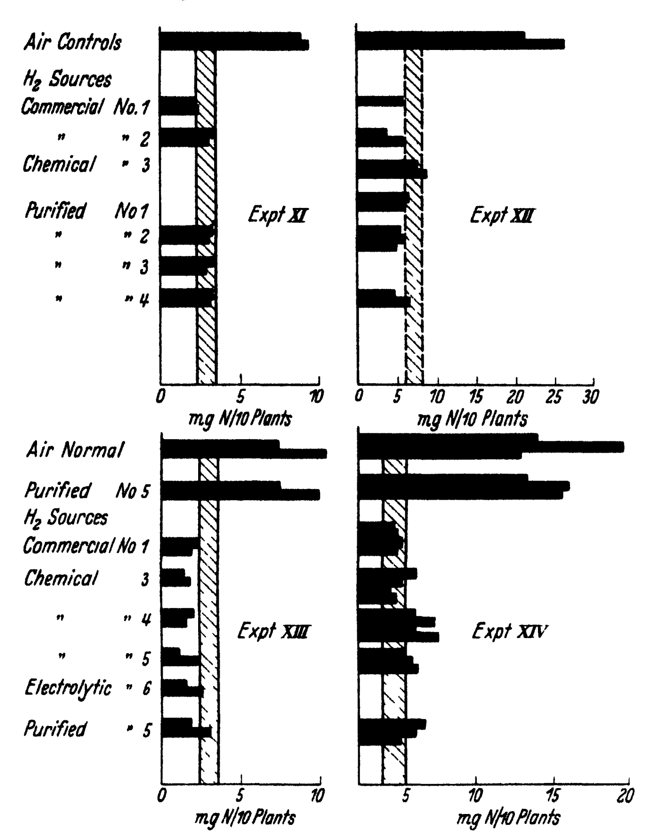


Fig. 2 Effect of hydrogen from different sources on nitrogen fixation by red clover. Atmosphere: p_{N_2} = 0.2 atm.; p_{O_2} = 0.2 atm., p_{H_2} = 0.6 atm. Cross-hatched area represents 25—35 per cent of total nitrogen found in the plants grown in air (average of samples). Details of sources of hydrogen given in text

of the nitrogen found in the plants grown in air. In order to insure that no inhibitory substance was contaminating the hydrogen as it passed through the purification chain, plants were grown in air which had been passed through the most extensive chain used (II-5). Such plants, labeled "purified air" in the figure, were entirely comparable to plants grown in normal air.

Finally, it was demonstrated that the inhibition observed with the different sources of hydrogen was identical with that noted in the

experiments of Part I, *viz.*, that it inhibited the nitrogen fixation process but had little or no effect on the uptake of combined nitrogen. The following data from Experiment XV show that the effects observed with the more highly purified sources of hydrogen were the same previously noted.

Source of hydrogen	Inoculated plants	Plants receiving NH_4NO_3
"Purified" air (II-5)	13.5	19.2
	12.9	15.5
Purified commercial H_2 No. 1 (II-5)	3.4	15.8
	2.0	16.2
Zn plus HCl (I-3)	3.9	15.4
	4.4	17.0
Al plus NaOH (I-4)	3.6	14.6
	3.0	15.8

All data refer to mg N per 10 plants.

These data, together with those of figure 2, lead to the conclusion that hydrogen as such inhibits the symbiotic nitrogen fixation process.

Summary.

When commercial electrolytic hydrogen is used to replace nitrogen in an atmosphere supplied inoculated red clover plants, the total nitrogen fixed is a linear function of the p_{N_2} (or p_{H_2}) in the atmosphere. If the nitrogen is not replaced or is replaced with helium or argon, the total nitrogen fixed is independent of the p_{N_2} until the latter is lowered to about 0,1 atm. This difference in the effect of the p_{N_2} on the fixation process suggests that hydrogen may be a specific inhibitor for this process. To test this hypothesis, it is necessary to determine whether there exists a real difference in the uptake of free and combined nitrogen by clover plants in the presence of hydrogen. Evidences concerned with such a test are given in this report.

The total quantity of nitrogen fixed by inoculated red clover plants is shown to be negatively associated with the p_{H_2} of the atmosphere furnished, *i. e.*, there is a significant linear regression between nitrogen fixed, as well as percentage nitrogen, in the plant and the p_{H_2} of the atmosphere (Regression experiments). Also, it was shown that differences which are statistically significant exist in the nitrogen content of inoculated plants when grown under different partial pressures of hydrogen (Analysis of variance experiments).

Although there was some indication that hydrogen in the atmosphere may inhibit the uptake of combined nitrogen to a slight extent, such evidence could not be confirmed by a statistical analysis of the

data. In five experiments, the regression coefficient between assimilation of combined nitrogen by clover plants and p_{H_2} of the atmosphere did not differ significantly from zero. Moreover, combination of these experiments, in order to increase the number of available experimental points for a single statistical test, resulted in no indication for the existence of a significant regression between the p_{H_2} in the atmosphere and assimilation of combined nitrogen. Analysis of variance in the quantity of combined nitrogen assimilated by plants grown in atmospheres of different p_{H_2} showed that there existed no significant differences in the nitrogen content of such plants and control plants grown in air.

The inhibiting effect is apparently due to hydrogen itself and not to an accompanying impurity since: (a) use of extensive purification chains failed to remove any effective substance; (b) hydrogen prepared from a variety of sources gave practically identical results.

It is concluded on the basis of the evidence discussed in the text that hydrogen is a specific inhibitor for the symbiotic nitrogen fixation process. The nature of the inhibition as well as the particular stage in the process that is affected await further studies.

Bibliography.

1) *Burk, D.*, Ergebn. d. Enzymforsch. **3**, 23—56, 1934. — 2) *Fisher, R. A.*, Statistical Methods for Research Workers. 3rd. Ed. (London) 1930. — 3) *Goulden, C. H.*, Methods of Statistical Analysis. 2nd. Ed. Burgess Publ. Co. (Minneapolis, Minn.) 1937. — 4) *Snedecor, G. W.*, Calculation and Interpretation of Analysis of Variance and Covariance. Collegiate Press (Ames, Iowa) 1934. — 5) *Werkman, C. H.*, J. Bact. **14**, 335—347, 1927. — 6) *Wilson, P. W.*, J. Amer. Chem. Soc. **58**, 1256—1261, 1936. — 7) *Wilson, P. W.*, and *E. B. Fred*, Nat'l. Acad. Sci. Proc. (Wash.) **23**, 503, 1937. — 8) *Wilson, P. W.*, and *C. E. Georgi*, Bot. Gaz. **94**, 346—363, 1932. — 9) *Wilson, P. W.*, *E. W. Hopkins* and *E. B. Fred*, Soil Sci. **32**, 251—268, 1931.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Bern.)

Untersuchungen über die Biologie von Ustilago violacea (Pers.) Fuck.

I. Mitteilung: Ernährungs- und Kulturbedingungen. Wirkungen des Saponins.

Von

S. Blumer.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Oktober 1937.)

Die vorliegende Arbeit stellt einen ersten Beitrag zu den im Botanischen Institut der Universität Bern nach verschiedenen Richtungen hin unternommenen Untersuchungen über die Biologie von *Ustilago violacea* dar. Es war die erste Aufgabe, die Ernährung des Pilzes zu untersuchen, um im Verlauf der weiteren Untersuchungen den Pilz jederzeit leicht in einer möglichst einfachen Nährlösung kultivieren zu können[1].

Sämtliche Versuche wurden mit einem von *Baarn* bezogenen Stamm von *Ustilago violacea f. Melandrii rubri* ausgeführt. Einige wenige Versuche machte ich mit *U. violacea f. Silenes nutantis* und *f. Dianthi deltoidis*, die beide ebenfalls von *Baarn* bezogen wurden.

1. Methode.

Das Wachstum des Pilzes in flüssigen Nährmedien läßt sich am besten mit Hefekulturen vergleichen. Durch die intensive Sprossung entsteht schon nach 2 Tagen eine zunächst homogen erscheinende Trübung der Kulturlösung. Bei ungestörter Entwicklung bildet sich später ein Bodensatz, der aus lebenden und toten Zellen besteht. Eine Kahmhautbildung wurde nie beobachtet. Bei starkem Wachstum bilden sich in älteren Kulturen oft zusammenhängende Sproßverbände, die als kleine Flocken erscheinen.

Der beste Maßstab für das Wachstum einer Kultur wäre natürlich die Bestimmung des Trockengewichts nach vorherigem intensivem Zentrifugieren. Da dieses Verfahren jedoch sehr umständlich und zeitraubend ist,

---

[1] Ich möchte in erster Linie Herrn Prof. Dr. *Schopfer* für seine tätige Mithilfe an dieser Arbeit bestens danken. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. *Rosenthaler* für seine Anregungen sowie für die Überlassung eines gereinigten Saponinpräparats. Der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der bernischen Hochschule bin ich für die Gewährung eines Beitrages zur Anschaffung von Chemikalien zu Dank verpflichtet. Für die Anschaffung von Apparaten konnten Mittel aus dem *Eduard Fischer*-Fonds des botanischen Instituts verwendet werden.

mußte nach anderen Methoden Umschau gehalten werden. Die Auszählung der Sproßzellen in der Zählkammer kommt nicht in Betracht, weil die Zellen oft in größeren oder kleineren Verbänden zusammenhängen. Es gelingt auch durch starkes Schütteln nicht, eine einigermaßen homogene Verteilung der Zellen zu erreichen. Es wurde ferner versucht, durch die Kurve der Titrationsazidität einen Maßstab für das Wachstum des Pilzes zu erhalten. *Ustilago violacea* bildet Ammoniak, was durch die *Nessler*sche Reaktion leicht festgestellt werden kann. Da aber in Nährlösungen verschiedener Zusammensetzung die Alkalinisierung sehr ungleich stark ist, läßt sich aus dem Grad der Veränderung der Titrationsazidität kein Schluß auf die Masse der gebildeten Pilzsubstanz ziehen.

In den letzten Jahren wurde wiederholt die nephelometrische Methode mit Apparaten verschiedenster Konstruktion für die Bestimmung der Vermehrung bei Bakterien und Hefen angewendet. Eine kritische Zusammenstellung dieser Methode, bezogen auf Keimzahlbestimmungen geben *Milatz* und *Rottier* (14). *Medwedew* und *Schelaumowa* (13) fanden bei Hefen eine sehr gute Parallelität zwischen der prozentualen Lichtabsorption und den durch Auszählung in der Zählkammer gefundenen Werten. Im hiesigen botanischen Institut wurde in letzter Zeit die nephelometrische Methode in verschiedenen Arbeiten bei Hefen angewendet. Es ergab sich mit dem lichtelektrischen Kolorimeter nach Dr. *B. Lange* eine sehr gute Übereinstimmung der nephelometrischen Werte mit der Kurve des Trockengewichts. Es mußte nun untersucht werden, ob dieser Apparat auch für *Ustilago violacea* brauchbare Ergebnisse liefern kann.

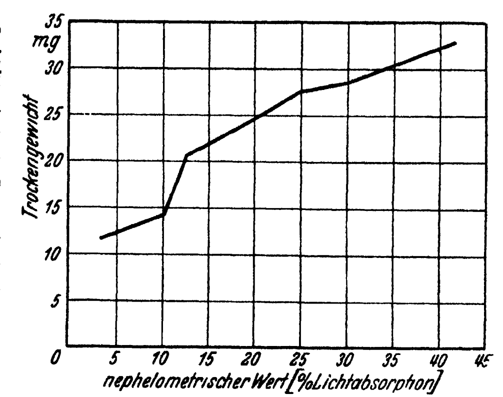


Abb. 1. Beziehung zwischen prozentualer Lichtabsorption und Trockengewicht des Mycels.

Um die Brauchbarkeit der nephelometrischen Methode für unser Objekt festzustellen, wurde in mehreren Kulturen von 30 ccm in *Erlenmeyer*-Kolben zunächst die prozentuale Lichtabsorption, der nephelometrische Wert, bestimmt. Hierauf wurde die Kulturlösung in drei kleine, abgewogene Zentrifugengläser zu 10 ccm verteilt, eine halbe Stunde zentrifugiert und bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Beziehungen zwischen Trockengewicht des Pilzes und dem nephelometrischen Wert sind in Abb. 1 dargestellt. Bei absoluter Übereinstimmung der beiden Werte müßte sich eine Gerade ergeben. Allerdings haben *Milatz* und *Rottier* (14) festgestellt, daß die durch Mikroorganismen verursachten Trübungen nephelometrisch nicht so genau mit der Keimzahl parallel gehen, während sich z. B. Suspensionen von $BaSO_4$ viel regelmäßiger verhalten. In unserem Falle zeigt sich immerhin eine

weitgehende Parallelität zwischen den nephelometrischen Werten und dem Trockengewicht des Pilzes. Für die Zuverlässigkeit der nephelometrischen Methode spricht bei unserem Objekt auch die geringe Variation der nephelometrischen Werte bei Parallelkolben einer Serie.

Ein Nachteil der nephelometrischen Methode mit diesem Apparat und bei unserm Pilz besteht darin, daß geringe Trübungen, die einem Trockengewicht von weniger als 10 mg in 30 ccm Kulturlösung entsprechen, überhaupt nicht sicher erfaßt werden können. Trübungen von 2 bis 3 % Lichtabsorption sind mit bloßem Auge ohne weiteres erkennbar, doch können sie mit unserm Apparat nicht sicher zahlenmäßig festgestellt werden. Abb. 1 zeigt übrigens deutlich, daß bei den niedrigsten Werten die Abweichung von der Geraden am großten ist. Eine weitere Fehlerquelle liegt für unser Untersuchungsobjekt in dem schon erwähnten Auftreten von flockigen Mycelverbänden, die entweder in der Kulturlösung schweben oder sich am Boden des Kolbens ansammeln. Solche Bildungen kommen meist erst in späteren Stadien der Entwicklung vor, in jungen Kulturen spielen sie keine Rolle. Aus diesem Grunde wurden für alle hier beschriebenen Versuche nur Kulturen von 12 bis 14 Tagen verwendet. Die Bildung solcher Aggregate kann auch hinausgeschoben werden, wenn die Kulturen jeden Tag einmal geschüttelt werden. Dadurch bleiben sie einigermaßen homogen. Daß durch das tägliche Schütteln die nephelometrischen Werte deutlich beeinflußt werden, konnte ich an einem Kontrollversuch feststellen. In fünf Kolben einer zwölftägigen Kultur, die jeden Tag einmal kräftig geschüttelt worden waren, ergaben sich folgende nephelometrische Werte:

18,0 18,5 19,0 19,0 20,5; Durchschnitt 19,0.

Die Parallelkultur, die während 12 Tagen nie berührt worden war, ergab:

13,0 14,0 14,5 18,0 18,0; Durchschnitt 15,5.

Es mußte also auch in dieser Hinsicht darauf geachtet werden, daß sämtliche Kolben einer Reihe gleich behandelt wurden.

Trotz dieser Fehlerquellen liefert die nephelometrische Methode auch bei unserm Objekt befriedigende Ergebnisse. Selbstverständlich sind diese relativ, aber immerhin zu Vergleichszwecken völlig genügend. Zum Teil konnten die unvermeidlichen Fehler durch zahlreiche Parallelkulturen mehr oder weniger kompensiert werden. Die in den folgenden Tabellen und Abbildungen gegebenen Werte sind, von wenigen Ausnahmen abgesehen, Durchschnittswerte aus mindestens fünf Bestimmungen. In den meisten Versuchen sind übrigens die Unterschiede in der Entwicklung so bedeutend, daß der Fehler der nephelometrischen Bestimmung relativ klein erscheint.

2. Allgemeine Ernährungsbedingungen.

Der untersuchte Stamm von *Ustilago violacea* wächst gut auf Agar mit Zusatz von 1 % *Wander*s Maltin. Glucoseagar ergibt etwas schwächeres Wachstum, auf Saccharoseagar ist die Entwicklung sehr schwach. Bei gutem Wachstum bildet sich ein weißliches Häutchen, das mit der Zeit faltig wird und oft leicht rötlich gefärbt erscheint.

Ranker (18) hat festgestellt, daß *Ustilago zeae* in verschiedenen synthetischen Nährlösungen gedeiht. Er hat das Wachstum in 26 verschiedenen Lösungen untersucht und mit dem auf Rübendekokt verglichen. Einige der von ihm empfohlenen Nährlösungen habe ich auch für *Ustilago violacea* verwendet, doch erhielt ich damit kein besseres Wachstum als mit der im hiesigen botanischen Institut gebräuchlichen einfachen Lösung, die aus 0,15 % Asparagin, 0,15 % KH_2PO_4, 0,05 % $MgSO_4$ und einer Kohlenstoffquelle besteht. Diese Nährlösung bildet die Grundlage für alle folgenden Versuche.

a) Kohlenstoffquellen.

Die in Tabelle I zusammengestellten Kohlenstoffverbindungen: Zucker, Alkohole, Glucoside und organische Säuren wurden der Nährlösung zu 1 % beigefügt. Gegenüber dem Wachstum in komplexen organischen Lösungen, z. B. Dekokten verschiedener Pflanzen, ist das Wachstum mit den in Tabelle I angeführten Kohlenstoffquellen durchweg als schwach zu bezeichnen; man vergleiche z. B. die in Tabelle VII erreichten nephelometrischen Werte! Andererseits müssen wir bedenken, daß ein nephelometrischer Wert von 3,0 schon einem Myceltrockengewicht von etwa 10 mg in 30 ccm Kulturlösung entspricht, also immerhin schon ein deutliches Wachstum darstellt. Bezeichnen wir ein Wachstum mit einem nephelometrischen Wert von mindestens 10 als gut, so käme nach Tabelle I nur Saponin als gute Kohlenstoffquelle in

Tabelle I. Nephelometrische Werte mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Kohlenstoffquelle	Wert	Kohlenstoffquelle	Wert
Glycerin	7,7	Aesculin	2,0
Xylose	1,9	Digitalin	1,5
Arabinose	1,5	α-Methylglucosid	2,5
Rhamnose	0,5	Saponin	13,7
Sorbit	1,2	Essigsäure	1,0
Mannit	0,8	Monochloressigsäure	1,6
Lavulose	1,5	Heptylsaure	1,0
Glucose	2,4	Glykolsäure	1,9
Mannose	1,0	Milchsäure	2,0
Galactose	1,5	Propionsaure	1,0
Saccharose	1,3	Gluconsäure	4,3
Maltose	4,2	Oxalsaure	1,7
Lactose	0,8	Bernsteinsaure	4,5
Raffinose	0,8	Fumarsäure	0
Inulin	5,5	Apfelsäure	3,0
Dextrin	5,5	Brenztraubensäure	2,5
Stärke	7,4	Weinsäure	1,0
Cellobiose	3,6	Citronensäure	5,2
Salicin	3,6	Glycerinsäure	2,0
Arbutin	3,0	Äthylalkohol, denaturiert	2,5

Frage. Ziemlich gutes Wachstum (nephelometrische Werte von 5 bis 10) haben wir mit Glycerin, Inulin, Dextrin, Stärke und Citronensäure. Schwaches, aber immerhin deutliches Wachstum (nephelometrische Werte von 2 bis 5) ergaben Glucose, Maltose, Cellobiose, Salicin, Arbutin, Aesculin, α-Methylglucosid, Milchsäure, Gluconsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Brenztraubensäure, Glycerinsäure und Alkohol[1].

Das ziemlich gute Wachstum auf Glycerin beruht wohl auf einer zufälligen Verunreinigung dieser Substanz. In einem nachträglich mit reinem Glycerin ausgeführten Versuch wurde nur noch ein nephelometrischer Wert von 3,0 erzielt. Wahrscheinlich beruht auch das ziemlich gute Wachstum auf Dextrin und Stärke auf einer Verunreinigung dieser Substanzen. Es wäre sonst kaum verständlich, daß bei Stärke bessere Ergebnisse zu beobachten waren als bei Maltose und Glucose.

Ähnlich verhält es sich mit dem Inulin. Tabelle II, in der das Wachstum mit verschiedenen Sorten von Inulin und bei Verwendung von zwei verschiedenen Stickstoffquellen dargestellt ist, zeigt, daß Inuline verschiedener Herkunft und verschiedener Beschaffenheit bedeutende Unterschiede aufweisen. Man darf wohl annehmen, daß auch hier lediglich zufällige Beimengungen für die Eignung dieser Inuline als Nährstoff ausschlaggebend sind. Nach dem Ausfall der *Fehling*schen Reaktion vor Einleitung und am Ende des Versuchs erscheint es überhaupt unwahrscheinlich, daß der Pilz das Inulin enzymatisch abbauen kann.

Tabelle II. Nephelometrische Werte auf verschiedenen Inulinpräparaten.

Inulin	Stickstoffquelle	
	Asparagin	NH_4NO_3
Kahlbaum rein (05123)	13,0	6,0
„ reinst (05122)	10,5	2,8
Schuchardt purissimum	3,0	0,5
„ reinst geprüft......	5,3	1,0

In allen Versuchen ergab Maltose ein etwas besseres Wachstum als Glucose. *Ranker* (18) hat die gleiche Beobachtung an *Ustilago zeae* gemacht. Es wurden nun Maltoseproben verschiedener Herkunft für die Nährlösungen verwendet. Maltose *Merck* ergab einen nephelometrischen Wert von 2,9, Maltose *Siegfried* von 3,0, Maltose *Kahlbaum* von 7,6, Maltose *Kahlbaum* gereinigt, dreimal umkristallisiert[2], ergab

[1] Denaturierter Alkohol: 125 kg enthalten 2,5 kg Methylalkohol, dem 30% Aceton beigemischt war. — [2] Ich verdanke dieses Präparat Herrn cand. phil. *W. Rytz*.

dagegen nur einen nephelometrischen Wert von 2,4. Das läßt darauf schließen, daß das bessere Wachstum auf Maltose *Kahlbaum* auf Nebenbestandteilen dieses Präparats beruht. *Kluyver* (10) hat nachgewiesen, daß in Maltose *Kahlbaum* 0,22 % Stickstoff (auf Eiweiß umgerechnet) enthalten sind. *Schopfer* (16) bestimmte den Stickstoffgehalt dieser Maltose zu 0,49 % und konnte außerdem feststellen, daß in Maltose *Kahlbaum* Wuchsstoffe vitaminischer Natur wirksam sind. Nehmen wir für die von uns verwendete Maltose die von *Schopfer* berechneten Werte als Grundlage an, so bringen wir mit der Maltose in einen Kolben von 30 ccm Nährlösung immerhin etwa 1,5 mg Stickstoff hinein. Unter der Voraussetzung, daß dieser Stickstoff assimilierbar ist, könnte diese Menge schon für ein gewisses Wachstum des Pilzes genügen. In welchem Ausmaß die in Maltose *Kahlbaum* vorhandenen Wuchsstoffe fördernd auf *Ustilago violacea* einwirken, wurde nicht untersucht.

Diese Ausführungen sollten zeigen, daß, abgesehen vom Saponin, auf das wir noch zurückkommen werden, keine der angewendeten Kohlenstoffquellen ein befriedigendes Wachstum des Pilzes ergibt. Wo eine mittelmäßige Entwicklung festzustellen ist, muß diese mit größter Wahrscheinlichkeit auf zufallige Beimengungen der betreffenden Substanzen zurückgeführt werden.

Es mußte nun noch untersucht werden, ob vielleicht Kombinationen verschiedener Kohlenstoffquellen ein besseres Wachstum ergeben. Wie die folgende Zusammenstellung zeigt, konnte durch Zuckergemische gelegentlich eine leichte Wachstumssteigerung erreicht werden. Mit den aufs Geratewohl vorgenommenen Mischungen wurden folgende nephelometrischen Werte erzielt:

Glucose 1 % + Glycerin (nicht rein) 1 %	10,4
Maltose *Merck* 0,5 % + Saccharose 0,5 % + Glycerin rein 0,5 %	3,2
Glucose reinst *La Roche* 0,5 % + Maltose *Merck* 0,5 %	2,6
Glucose 0,5 % + Saccharose 0,5 %	0,6
Arabinose, Glucose, Maltose, Glycerin (nicht rein), je 0,2 %....	7,0
Xylose, Glucose, Saccharose, Glycerin (nicht rein), je 0,5 %...	5,0

Es zeigte sich bei diesen Mischungen also im besten Falle eine Additionswirkung, wobei man sich darüber klar sein muß, daß auch hier eigentlich nicht die verwendeten Kohlenhydrate, sondern ihre Verunreinigungen unbekannter Natur für das Wachstum des Pilzes ausschlaggebend sind.

b) *Stickstoffquellen.*

Zur Feststellung einer geeigneten Stickstoffquelle wurde der gewöhnlichen Nährlösung 1 % Maltose *Kahlbaum* und 0,5 % Glycerin (nicht rein) als Kohlenstoffquelle beigefügt. Diese beiden Substanzen bewirken schon allein ein gewisses Wachstum, was in dem ziemlich

Tabelle III. Wachstum mit verschiedenen Stickstoffquellen.

N-Quelle	Nephelometrische Werte	N-Quelle	Nephelometrische Werte
Fibrin	35,7	Ammoniumsulfat	12,35
Pepton-*Witte*	26,6	Glykokoll	12,0
Pepton-*Merck* f. bakt. Zw.	21,75	Ammoniumchlorid	11,4
Ammoniumzitrat	18,0	Ammoniumnitrat	10,6
Asparagin	15,1	Nucleinsäure	10,6
Harnstoff	14,5	Kaliumnitrat	7,4
Ammoniumtartrat	14,4	Kontrolle ohne N	6,75

hohen nephelometrischen Wert der Kontrolle ohne N (Tabelle III) zum Ausdruck kommt. Dieser Wert müßte also eigentlich von den übrigen Werten in Abzug gebracht werden. Tabelle III gibt die nephelometrischen Werte bei Zugabe von 0,2 % der Stickstoffverbindung.

Die besten Stickstoffquellen sind also die komplexen Substanzen, die in verschiedenem Grade abgebautes Eiweiß enthalten und die wohl auch durch ihre Begleitstoffe wirken. Einfache Aminosäuren und Ammoniumsalze nehmen eine Mittelstellung ein, während Nucleinsäure und KNO_3 kaum verwertet werden können. Im Gegensatz zu dieser Feststellung fand *Ranker* für *Ustilago zeae* gutes Wachstum bei Zusatz von $NaNO_3$ und KNO_3. Auch Ammoniak scheint für *Ustilago violacea* als Stickstoffquelle in Betracht zu kommen, doch sind die Ergebnisse hier zweifelhaft, da bei Zugabe von Ammoniak in den Lösungen leicht Ausfällungen entstanden, die sich dann bei der Bestimmung des nephelometrischen Wertes störend bemerkbar machten. In den weiteren Versuchen wurde, wenn nichts anderes bemerkt ist, stets Asparagin als Stickstoffquelle verwendet.

c) *Wasserstoffionenkonzentration.*

Aus den Versuchen von *Ranker* scheint hervorzugehen, daß die Wasserstoffionenkonzentration für das Gedeihen von *Ustilago zeae* keine ausschlaggebende Rolle spielt. Die Lösung, in der er das beste Wachstum beobachtete, hatte nach der Sterilisation ein p_H von 5,6. Er konnte aber auch in anderen Lösungen, deren p_H bei 3 bzw. 6,2 lag, gutes Wachstum feststellen.

Bei *Ustilago violacea* setzte das Wachstum in ungepufferten Lösungen etwa bei p_H 3,5 bis 4 ein und erreichte schon bei p_H 4,5 maximale Werte, die bis p_H 6,5 mehr oder weniger konstant blieben. In alkalischen Lösungen war das Wachstum bedeutend geringer, immerhin zeigte der Pilz auch bei p_H 8,3 noch mittelmäßiges Wachstum. Da auch hier der Wasserstoffionenkonzentration scheinbar keine ausschlaggebende Bedeutung zukommt, wurden keine weiteren Versuche unternommen, die Nährlösungen auf ein bestimmtes optimales p_H einzustellen. Das wäre übrigens wegen der ziemlich starken Ammoniakbildung des Pilzes auch

in gepufferten Lösungen ziemlich schwierig gewesen. Die Veränderung des p_H durch die Ammoniakbildung des Pilzes läßt sich sehr schön zeigen, wenn der beimpften Nährlösung etwas Universalindikator *Merck* beigefügt wird. Der Pilz scheint in seinem Wachstum durch die im Indikator vorhandenen Stoffe nicht merklich gehemmt zu werden. Im Verlauf von 14 Tagen geht die Farbe der Nährlösung von rot nach gelbgrün und grün (p_H 7) über. In den später zu besprechenden Versuchen zeigte sich überall, daß die Alkalisierung der Nährlösung weniger intensiv ist, wenn neben Saponin noch ein Zucker in der Nährlösung vorhanden ist.

3. Wirkung des Saponins auf das Wachstum.

a) Wirkung von Saponin allein.

Aus Tabelle I geht hervor, daß Saponin von allen verwendeten Kohlenstoffquellen die beste Wirkung auf das Wachstum von *Ustilago violacea* hatte. Dies ist weiter nicht verwunderlich, da alle Handelspräparate von Saponin zahlreiche andere Stoffe enthalten. So enthält z. B. Saponinum purissimum album *Merck* als Beimengung etwa 30 bis 40 % Milchzucker [*Martius* (12)]. Eine im hiesigen Institut durch Herrn *V. Kocher* ausgeführte Stickstoffbestimmung ergab, daß das reinste Handelspräparat, Sap. pur. album *Schuchardt*, noch 0,3 % Stickstoff enthält. Gibt man also in einen Kolben mit 30 ccm Nährlösung 0,5 % Saponin, wie dies in meinen Versuchen die Regel war, so wurden damit etwa 0,45 mg Stickstoff in die Nährlösung gebracht, also immerhin eine Menge, die schon ein gewisses Pilzwachstum ermöglichen kann. *Ustilago violacea* wächst deshalb in einer 1 %igen Saponinlösung in dest. Wasser, ohne jeden anderen Zusatz, schon ziemlich gut. Es konnten mit Saponin allein schon nephelometrische Werte bis zu 11,7 erreicht werden. Auch die auf *Silene nutans* und *Dianthus deltoides* vorkommenden Stämme von *Ustilago violacea* wuchsen in der gewöhnlichen Nährlösung mit 0,5 % Saponin als Kohlenstoffquelle sehr gut. Nicht selten traten in den Saponinlösungen Bakterien oder Pilze, besonders *Penicillium*, als Verunreinigungen auf. Dies beweist, daß in den Saponinpräparaten des Handels wohl alle für das Leben der Mikroorganismen notwendigen Stoffe enthalten sind. Daß es daneben auch Organismen gibt, die auf Saponin nicht wachsen, ist selbstverständlich. So entwickelte sich z. B. ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* in einer Nährlösung mit 0,5 % Saponin überhaupt nicht. Das Verhalten von *Ustilago violacea* gegenüber Saponin ist vor allem aus dem Grunde interessant, weil alle Nährpflanzen dieses Pilzes mehr oder weniger saponinhaltig sind. Man könnte sich deshalb fragen, ob das Saponin für die Spezialisation des Pilzes eine ausschlaggebende Rolle spielt.

Das Wachstum des Pilzes bei zunehmender Saponinkonzentration ist in Abb. 2 dargestellt. Geringe Konzentrationen lösen nur ein schwaches Wachstum aus. Erst bei einem Saponingehalt von über 1 ‰ setzt ein intensives Wachstum ein, das bis zur höchsten verwendeten Konzentration von 5 % ziemlich regelmäßig zunimmt. Irgendwelche Hemmungen konnten auch bei einer Saponinkonzentration von 5 % nicht festgestellt werden. Der Versuch zeigt also, daß es absolut unzutreffend ist, wenn die Saponine nach ihren hämolytischen Eigenschaften schlechthin als Gifte bezeichnet werden, worauf übrigens *Boas* schon wiederholt hingewiesen hat.

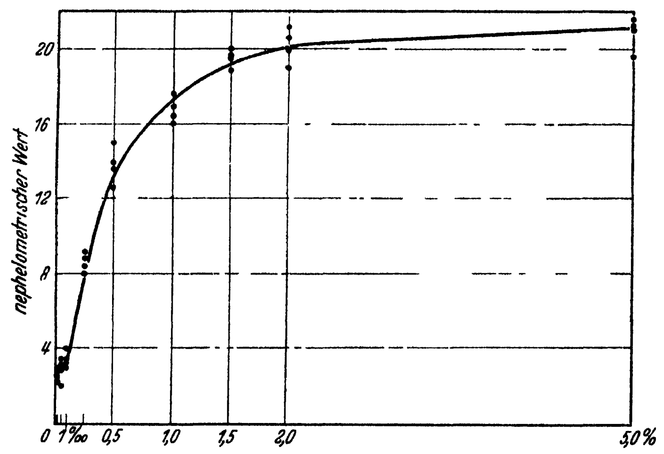


Abb. 2. Nephelometrische Werte bei zunehmender Saponinkonzentration.

Es erhebt sich nun die Frage, ob *Ustilago violacea* das Saponin als Kohlenstoffquelle benutzen kann, d. h. ob der Pilz imstande ist, Saponin abzubauen und die Spaltungsprodukte zu verwerten, oder ob Saponin nur durch seine Begleitsubstanzen günstig auf das Wachstum einwirkt. Diese Frage könnte nur durch Versuche mit absolut reinem kristallisiertem Saponin entschieden werden. Ich war leider nicht in der Lage, die ziemlich komplizierte Reinigung durchführen zu können. Ein Versuch, durch Behandlung mit Tierkohle die wachstumsfördernden Stoffe vom Saponin zu trennen, mißlang. Das Tierkohlefiltrat löste nur noch sehr geringes Wachstum aus und enthielt nur Spuren von Saponin. Dieses wird, wie auch *Martius* (12, S. 57) feststellte, von der Tierkohle zurückgehalten. Wurde dann mit Alkohol-Salzsäure eluiert, eingedampft und neutralisiert, so zeigte das Eluat starke Schaumbildung und war für das Wachstum des Pilzes ungefähr gleich günstig wie unbehandeltes Saponin.

Einige Anhaltspunkte zur Lösung der Frage, ob das Saponin selbst oder seine Verunreinigungen für das Wachstum des Pilzes von Bedeu-

tung sind, können die Versuche mit Saponinen verschiedener Herkunft und verschiedener Reinheit geben. In Abb. 5 (S. 470) ist durch die schwarzen Säulen (*B*) das Wachstum des Pilzes in der gewöhnlichen Nährlösung mit 0,5 % Saponin ohne andere Kohlenstoffquelle bezeichnet, die drei ersten Saponinproben sind Produkte der Firma *Schuchardt*. Abb. 5 zeigt deutlich, daß das Wachstum in Sap. crudum am besten ist, während in dem weitgehend gereinigten Sap. pur. album das geringste Wachstum zu beobachten ist. Dies gilt sowohl für Asparagin als auch für Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle; bei diesem ist die Abnahme etwas deutlicher, wohl weil es an sich vom Pilz weniger gut verwertet werden kann (vgl. Tabelle III, S. 464), und weil dieser um so mehr von den N-haltigen Verunreinigungen des Saponins abhängig ist. Die Versuche mit diesen drei *Schuchardt*-Präparaten weisen also darauf hin, daß der Wert des Saponins für die Ernährung des Pilzes in erster Linie durch seine Verunreinigungen bedingt ist. Es liegen vorläufig keine Anhaltspunkte vor, die darauf schließen lassen, daß das Saponin selbst durch den Pilz gespalten und verwertet wird. Auch bei den schwächsten Saponinkonzentrationen zeigte die Kulturflüssigkeit am Ende des Versuchs noch eine ungefähr gleich starke Schaumbildung wie in der unbeimpften Kontrolle, was darauf schließen läßt, daß das Saponin nicht gespalten wurde. Bei einer enzymatischen Spaltung des Saponins müßte das wasserunlösliche Sapogenin entstehen. Es wurde aber nie ein solcher Niederschlag beobachtet. Fügt man einer 1 %igen Saponinlösung etwas bei 56° getrocknete Pilzmasse bei und läßt sie 2 Tage bei 28° einwirken, so steigt der Gehalt an reduzierenden Substanzen von 0,4 auf 0,9 ‰. Es ist jedoch kaum anzunehmen, daß diese unbedeutende Vermehrung der reduzierenden Substanzen auf die Tatigkeit einer Saponase zurückgeführt werden darf. Wäre dies der Fall, so müßte wohl die Spaltung bedeutend mehr reduzierende Zucker liefern, auch müßte wasserunlösliches Sapogenin entstehen. Die leichte Vermehrung der reduzierenden Substanzen ist wohl auf den Abbau von Begleitstoffen durch die Pilzenzyme zurückzuführen.

b) Wirkung von Saponin mit Glucose.

Es wurde früher ausgeführt, daß Mischungen verschiedener Zucker das Wachstum von *Ustilago violacea* nicht nennenswert fördern. Ganz andere Ergebnisse hatten aber Mischungen von Saponin und Glucose. Hier handelt es sich nicht mehr um eine Additionswirkung, sondern das Wachstum in Saponin plus Glucose ist nicht selten mehr als doppelt so stark als in den beiden einzelnen Komponenten zusammen. Abb. 3 zeigt das Ergebnis eines Zeitversuchs. Diese starke Förderung durch Zusatz von Saponin (Handelspräparate) zu Glucose wurde in zahlreichen Versuchen immer wieder bestätigt und darf als sichergestellt gelten.

Es erhob sich zunächst die Frage, ob vielleicht durch die Sterilisation der schwach sauren Nährlösungen im Autoklaven das Saponin teilweise hydrolysiert werde, so daß das dadurch entstehende Zuckergemisch für den Pilz eine bessere Kohlenstoffquelle darstellen würde als Glucose allein. Es wurden Parallelversuche angesetzt mit Nährlösungen, in denen das Saponin bei 118° im Autoklaven sterilisiert wurde, und solchen, denen nachträglich durch Chamberlandkerzen kalt sterilisiertes Saponin beigefügt wurde. In beiden Fällen enthielt die Grundlösung 1 % Glucose. Die Saponinkonzentration war in beiden Reihen 0,5 %. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 4 dargestellt. Es zeigt sich, daß die fördernde Wirkung des Saponins, sei es im Autoklaven oder kalt sterilisiert, auf das Wachstum des Pilzes ungefähr gleich ist. Die geringen Unterschiede sind wohl rein zufällig. Es kann sich also nicht um die Wirkung irgendwelcher Abbauprodukte des Saponins handeln.

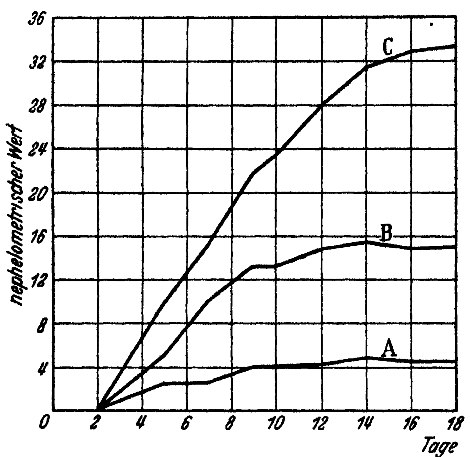


Abb. 3. Nephelometrische Werte mit Glucose 1 % (*A*), Saponin 0,5 % (*B*) und Saponin 0,5 % + Glucose 1 % (*C*).

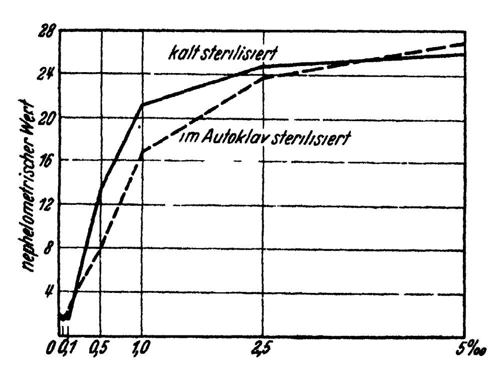


Abb. 4. Nephelometrische Werte mit 1 % Glucose und steigenden Konzentrationen von Saponin.

Ein Vergleich der Abb. 2 und 4 zeigt schon, daß der Schwellenwert für die Wirkung des Saponins bei Anwesenheit von Glucose (Abb. 4) bedeutend tiefer liegt als ohne Glucose. Tabelle IV gibt nun die Ergebnisse von zwei Versuchen, die diese Unterschiede noch klarer zeigen sollen. Es ist dabei zu betonen, daß die nephelometrischen Werte unter 3 nicht sehr

Tabelle IV. Schwellenwerte für die Saponinwirkung.

Saponinkonzentration	Nephelometrische Werte ohne Glucose	Nephelometrische Werte mit 1 % Glucose	Saponinkonzentration	Nephelometrische Werte ohne Glucose	Nephelometrische Werte mit 1 % Glucose
0,01 ‰	0,8	1,6	0,5 ‰	2,5	10,4
0,05 ‰	2,1	—	1 ‰	1,9	15,6
0,1 ‰	2,4	2,0	2,5 ‰	9,2	24,6
0,25 ‰	2,2	2,9	5 ‰	14,6	[illegible]

zuverlässig sind. *Mit* Glucose haben wir hier gutes Wachstum bei einer Saponinkonzentration von 0,5 ‰ an, d. h. in einem Kolben mit 30 ccm Nährlösung müssen mindestens 15 mg Saponin vorhanden sein, um das Wachstum, das einem nephelometrischen Wert von etwa 10 entspricht, zu ermöglichen. Enthält die Nährlösung keine Glucose, so liegt der Schwellenwert etwas über 2,5 ‰, d. h. das gleiche Wachstum erfordert eine mindestens fünfmal größere Menge von Saponin. Dieser Unterschied ist verständlich, wenn man bedenkt, daß Saponin in Abwesenheit von Glucose nur durch seine Verunreinigungen als Nährstoff in Betracht kommt. Dabei besteht wohl für den Pilz ein Mangel an assimilierbaren Kohlenstoffverbindungen. Ist aber Glucose in der Nährlösung vorhanden, so kommt die Wirkung der im Saponin enthaltenen wachstumsfördernden Stoffe ganz zur Geltung.

In den erwähnten Versuchen wurde immer eine Nährlösung mit 1 % Glucose verwendet. Der in Tabelle V zusammengestellte Versuch zeigt, daß die Förderung des Pilzwachstums schon bei Anwesenheit sehr kleiner Mengen von Glucose eintritt. Die in der letzten Spalte angegebene Verhältniszahl bezieht sich auf das als 100 % angenommene Wachstum des Pilzes in der Nährlösung mit 0,5 % Saponin ohne Glucose.

Tabelle V. Wachstum bei zunehmender Glucosekonzentration.

Nährlösung mit	Glucosemenge absolut je Kultur mg	Nephelometrischer Wert	%
Saponin 0,5 % (ohne Glucose)	0	17,6	100
„ 0,5 % + Glucose 0,10 ‰	3	17,2	97,7
„ 0,5 % + Glucose 0,25 ‰	7,5	18,8	102,5
„ 0,5 % + Glucose 0,50 ‰	15	22	125
„ 0,5 % + Glucose 1,00 ‰	30	29,5	167,6
„ 0,5 % + Glucose 2,50 ‰	75	24,1	135,8
„ 0,5 % + Glucose 5,00 ‰	150	25,3	143,7
„ 0,5 % + Glucose 10,00 ‰	300	25,0	142,0

Eine Glucosemenge von 15 mg genügt also schon, um das Wachstum des Pilzes um 25 % gegenüber Saponin zu fördern. Dabei muß man sich stets der Tatsache bewußt sein, daß Glucose ohne Saponinzusatz vom Pilz kaum verwertet werden kann. Daß in diesem Versuch bei 10 ‰ Glucose wieder eine leichte Abnahme des nephelometrischen Wertes eintritt, beruht wohl auf irgendeiner Zufälligkeit. In anderen Versuchen wurden bei dieser Glucosekonzentration bedeutend höhere Werte beobachtet.

Alle in diesem Abschnitt besprochenen Versuche wurden mit einem Saponinpräparat der Firma *Siegfried* ausgeführt. Es mußte nun noch festgestellt werden, wie sich andere Handelspräparate bei Zusatz von Glucose verhalten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 5 dargestellt. Wir stellten früher fest, daß in Abwesenheit von Glucose,

das am stärksten verunreinigte Sap. crudum *Schuchardt* das beste Wachstum ergibt. Es ist nun auffällig, daß durch Zusatz von Glucose das Wachstum hier nur unbedeutend gesteigert wird. Mit Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle sind die nephelometrischen Werte mit und ohne Glucose genau gleich. Schon etwas größer ist die Wachstumssteigerung durch Glucose bei Sap. depuratum. Am deutlichsten ist die Zunahme bei der reinsten Saponinprobe, Sap. pur. album. Nehmen wir auch hier das Wachstum auf dem entsprechenden Saponin ohne Glucose als 100 % an, so kommen wir mit Verwendung von Asparagin als Stickstoffquelle mit Zusatz von 1 % Glucose auf rund 210 %, mit Ammoniumnitrat sogar auf 450 %. Offenbar sind in den weniger gereinigten Saponinpräparaten gewisse Stoffe enthalten, die das Pilzwachstum hemmen. Daß auch die reinsten Handelspräparate noch namhafte Verunreinigungen enthalten, wurde schon ausgeführt.

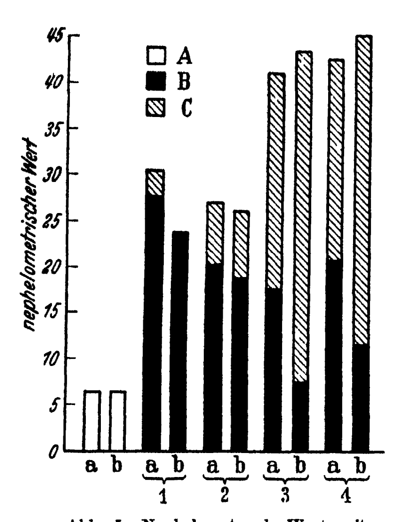


Abb. 5. Nephelometrische Werte mit verschiedenen Saponinpräparaten: Sap. crudum *Schuch.* (1) Sap. depur. *Schuch.* (2), Sap. pur alb. *Schuch.* (3), Sap. *Siegfried* (4), *a* mit Asparagin, *b* mit NH_4NO_3 als N-Quelle — *A* 1 % Glucose, *B* 0,5 % Saponin, *C* 1 % Glucose + 0,5 % Saponin

c) *Wirkung von Saponin mit anderen Kohlenstoffquellen.*

Es war ohne weiteres zu erwarten, daß die wachstumsfördernde Wirkung des Saponins nicht nur mit Glucose, sondern auch in Verbindung mit anderen Kohlenstoffquellen zutage tritt. Tabelle VI zeigt, daß sämtliche untersuchten Kohlenstoffquellen in Kombination mit Saponin (pur. album *Schuchardt*) ein besseres Wachstum des Pilzes ergeben als für sich allein. Der Grad der Wachstumszunahme durch Saponinzusatz allerdings schwankt innerhalb weiter Grenzen. Am stärksten ist die Zunahme bei Saccharose und Lävulose, wo man mit Saponinzusatz nephelometrische Werte erreicht, die über 20 mal höher sind als ohne Saponin. Andererseits gibt es verschiedene Stoffe, bei denen mit Saponinzusatz nicht einmal die Werte erreicht werden, die der Pilz normalerweise in Saponin allein erreicht.

Ausgenutzt werden vom Pilz alle Kohlenstoffquellen, die mit Saponin zusammen ein Wachstum von über 100 % ergeben, nämlich Saccharose, Glucose, Lävulose, Mannose, Salicin, Arabinose, Sorbit, Maltose und Mannit. Die übrigen sind auch mit Saponin entweder nicht verwertbar oder wirken direkt hemmend, wie Xylose, Lactose und Alkohol.

Tabelle VI. Wachstumszunahme bei Zusatz von Saponin.

Kohlenstoffquelle (1 %)	Nephelometrische Werte		%
	ohne Saponin	mit 0,5 % Saponin	
Saponin pur. album. (0,5 %)		14,2	100
Glycerin (rein)	3,4	13,1	92,2
Xylose	1,4	3,6	25,3
Arabinose	2,0	22,4	157,7
Sorbit	0,9	22,0	154,2
Mannit	0,5	18,3	128,8
Lävulose	1,0	25,4	185,9
Glucose	1,8	27,0	190,0
Mannose	1,0	24,8	174,6
Saccharose	1,3	29,0	204,2
Maltose (*Merck*)	2,2	20,8	146,4
Lactose	0	1,0	7,0
Raffinose	0,5	7,6	53,5
Inulin (reinst gepr.)	0,8	5,5	38,7
Dextrin	4,5	12,9	90,8
Starke	6,3	7,5	52,8
Cellobiose	1,0	9,7	68,3
Salicin	2,4	23,2	163,3
Alkohol denat.	1,4	3,6	25,3

Boas (5, S. 151) erwähnt, daß die Giftwirkung des Saponins vielfach in alkalischen Lösungen verstärkt, in sauren abgeschwächt werde. Zur Nachprüfung dieser Frage eignet sich *Ustilago violacea* nicht sehr gut, weil dieser Pilz in alkalischen Lösungen nur kümmerlich gedeiht. Immerhin glaube ich aus einem Versuch, der in Tabelle VII dargestellt

Tabelle VII. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

p_H	Nephelometrische Werte		p_H	Nephelometrische Werte	
	ohne Saponin	mit 0,5 % Saponin		ohne Saponin	mit 0,5 % Saponin
4,5	2,8	28,0	7,0	3,2	26,0
5,5	3,0	28,75	8,2	1,0	9,5
6,0	2,5	29,4			

ist, schließen zu dürfen, daß für *Ustilago violacea* das Saponin auch in alkalischer Lösung nicht giftig wirkt. Um auch ohne Zusatz von Saponin ein gewisses Wachstum zu erzielen, wurden hier gepufferte Nährlösungen mit Maltose *Kahlbaum*, Saccharose und Glycerin (je 0,3 %) als Kohlenstoffquelle verwendet. Trotzdem blieben leider in diesem Versuch die nephelometrischen Werte ohne Saponinzusatz sehr niedrig. Mit Saponin wurden überall acht- bis zehnmal höhere Werte beobachtet als ohne Saponin. Die Reaktion der Nährlösung scheint also in unserm Falle auf den Grad der Wachstumsförderung durch Saponinzusatz keinen

Einfluß zu haben. Bei p_H 8,2 sinken die nephelometrischen Werte sowohl mit als ohne Saponinzusatz auf ungefähr ein Drittel der maximalen Werte herab.

d) Wirkung eines gereinigten Saponinpräparates.

Herr Prof. Dr. *Rosenthaler* hatte die Freundlichkeit, mir eine kleine Probe eines weitgehend gereinigten Saponinpräparats zu überlassen, das von ihm 1912 aus der sechsten Fällung von Saponin *Merck* gewonnen worden war. Glücklicherweise besaß Herr Prof. *Rosenthaler* auch noch Material des Ausgangspräparats (Sap. *Merck*), so daß sich hier eine gute Gelegenheit bot, die Wirkung der Verunreinigungen des Saponins zu erkennen. Da mir nur etwa 1 g des reinen Saponins zur

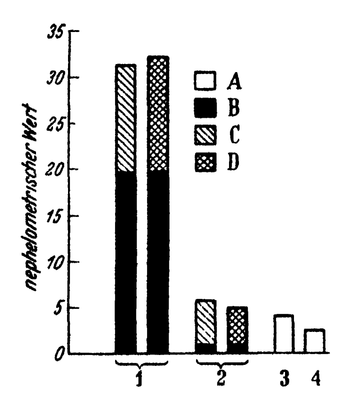


Abb 6. Nephelometrische Werte mit Sap. *Merck* (1), dem gereinigten Präparat (2), Glucose (3) und Saccharose (4). — *A* Glucose (3), Saccharose (4), *B* 0,5 % Saponin, *C* 0,5 % Saponin + 1 % Glucose, *D* 0,5 % Saponin + 1 % Saccharose.

Verfügung stand, konnte nur eine kleine Zahl von Kulturen angesetzt werden. Die Ergebnisse scheinen immerhin eindeutig zu sein. Sie sind in Abb. 6 graphisch dargestellt. Das Wachstum des Pilzes ist in reinem Saponin sehr schwach, sogar schwächer als in Glucose allein. Man darf also das gute Wachstum auf den Handelspräparaten wohl ausschließlich auf die Verunreinigungen des Saponins zurückführen.

Kombiniert man Saponin *Merck* mit Glucose oder Saccharose, so ergibt sich ein sehr gutes Wachstum mit nephelometrischen Werten von rund 30. Das gereinigte Präparat mit Glucose und Saccharose zusammen zeigt dagegen nur sehr geringes Wachstum. Die nephelometrischen Werte sind nicht wesentlich höher als die mit Saccharose oder Glucose allein. Die Unterschiede bleiben in allen Fällen innerhalb der Fehlergrenzen. Die günstige Wirkung, die ein Saponinzusatz auf die Assimilation verschiedener Kohlenhydrate und Glucoside durch *Ustilago violacea* ausübt, ist also nicht eine Wirkung des Saponins, sondern sie ist auf die Begleitstoffe zurückzuführen, die in allen Präparaten des Handels vorhanden sind, die aber durch weitgehende Reinigung des

Saponins entfernt werden können. Welcher Art diese wachstumsfördernden Stoffe sind, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Es ist möglich, daß es sich um bekannte Wuchsstoffe handelt. Auch *Boas* und *Steude* (6) vermuten, daß die Saponine „Wuchshormone“ eingeschlossen enthalten könnten.

e) Wachstum des Pilzes auf pflanzlichen Dekokten.

Nach den bisherigen Ergebnissen scheinen die Saponine bzw. ihre noch unbekannten Begleitstoffe für die Entwicklung von *Ustilago violacea* von großer Bedeutung zu sein. Es fragt sich nun, ob diese Stoffe auch unter natürlichen Bedingungen für den Pilz eine Rolle spielen, und ob sie vielleicht für die Wirtswahl des Pilzes bestimmend sind. Zur ersten Orientierung sollte zunächst festgestellt werden, ob der Pilz in Dekokten saponinhaltiger Pflanzen besser gedeiht als auf saponinfreien. Nach der Zusammenstellung bei *Kofler* in *Klein*s Handbuch der Pflanzenanalyse wurden einige Saponinpflanzen ausgewählt. Die Pflanzenteile wurden kurz aufgekocht, das Dekokt 2 Stunden stehengelassen und dann ein- oder mehrmals filtriert. 15 ccm des Dekoktes wurden der gleichen Menge einer Nährlösung mit 0,3 % Asparagin, 0,3 % KH_2PO_4 und 0,1 % $MgSO_4$ beigefügt. Der Kohlenstoffbedarf des Pilzes mußte also ganz aus dem Dekokt gedeckt werden. Das Wachstum war in diesen komplexen Lösungen im allgemeinen gut, wie Tabelle VIII zeigt.

Tabelle VIII. Wachstum auf pflanzlichen Dekokten.

Pflanze	Saponingehalt	Nephelometrische Wert
Pulmonaria officinalis, Blätter	+	48,4
Equisetum hiemale, Stengel	+	34,5
Spinacia oleracea, Blätter	+	30,3
Struthiopteris germanica, Wurzelstock	+	27,5
Convallaria majalis, Blätter	+	26,5
Saponaria officinalis, Wurzelstock	+	23,0
Viola sp. cult., Blätter	+	22,5
Taraxacum officinale, Blätter	— *	20,9
Prunus Laurocerasus, Blätter	—	18,4
Melandrium album, Blätter	+	17,3
Rosa sp. cult., Blätter	—	10,5
Hedera Helix, Blätter	+	9,5
Abies Nordmanniana, Nadeln	—	4,5
Ranunculus Ficaria, Blätter	— *	1,2

* Nach *Boas* (1937) ebenfalls saponinhaltig.

In diesem Versuch erfolgte allerdings die beste Entwicklung des Pilzes auf den Dekokten von Saponinpflanzen. Daß aber noch andere Faktoren für die Ernährung des Pilzes von ausschlaggebender Be-

deutung sein müssen, beweist die Tatsache, daß eine so ausgesprochene Saponinpflanze wie *Hedera Helix*, deren Blatt nach *Boas* mindestens fünf Saponine enthält, für den Pilz nur eine sehr mittelmäßige Nahrungsquelle darstellt. Auffällig ist auch, daß der Pilz auf dem Dekokt seiner Nährpflanze, *Melandrium*, gar nicht besonders gut gedeiht. Das schlechte Wachstum in den Dekokten von *Abies* und *Ranunculus* muß wohl auf besondere Hemmungsstoffe zurückgeführt werden.

4. Allgemeine Ergebnisse.

Die Saponine werden nach ihren hämolytischen Eigenschaften oft allgemein als Gifte bezeichnet.

Daß dies gegenüber Hefen und anderen Pilzen nicht zutrifft, wurde von *Boas* wiederholt betont. Auch *Czapek* (8) erwähnt, daß Saponine nach den Erfahrungen von *Fermi* für Mikroorganismen wenig schädlich seien. Nach seinen eigenen Erfahrungen scheint auch die Giftwirkung auf Phanerogamenzellen nicht sehr intensiv zu sein. *Seifriz* (17) fand Zellen von *Elodea* ziemlich widerstandsfähig gegen Saponin. Das bestätigt auch *Munthiu* (15), die *Elodea*-Blätter in einer 2 %igen Lösung tagelang lebend erhalten konnte.

Klebs (9) kam zum Schluß, daß Saponin für *Saprolegnia mixta* und für *Sporodinia grandis* eine ungeeignete Kohlenstoffquelle darstellt. Dagegen stellte *Boas* (4) bei *Rhizopus* eine Erhöhung des Erntegewichtes und eine Anregung der Sporangienbildung als Wirkung eines Saponinzusatzes fest. *Aspergillus niger* läßt sich nach *Boas* und *Steude* (6) in einer verarmten Nährlösung durch Saponin zu vermehrtem Wachstum anregen.

Ich selber beobachtete wiederholt Bakterien, die sich in Saponinlösungen ohne irgendwelche anderen Stoffe sehr gut entwickelten. In Nährlösungen mit Saponinzusatz gedeihen zahlreiche Pilze, u. a. *Penicillium*-Arten, recht gut. Für *Ustilago violacea* stellen die verschiedenen Handelspräparate von Saponin eine erstklassige Nahrungsquelle dar, besonders in Gegenwart gewisser Kohlenhydrate oder Glucoside. Da wohl sämtliche Nährpflanzen von *Ustilago violacea* mehr oder weniger saponinhaltig sind, erschien mir eine Untersuchung des Verhaltens dieses Pilzes gegenüber Saponin von besonderem Interesse zu sein. Es gelang mir auch bei Anwendung starker Saponinkonzentrationen (5 %) nicht, bei *Ustilago* irgendwelche Wachstumshemmungen zu bewirken, die sich in den nephelometrischen Werten ausgedrückt hätten.

Boas wies in mehreren Arbeiten (1 bis 4) auf die durch Saponin bewirkte Förderung der Gärtätigkeit von Hefen hin. Diese Förderung wird bei Anwesenheit von Zellgiften und großen Salzmengen aufgehoben, und es treten dann starke Schädigungen der Hefezelle auf. *Boas* erklärt diese Erscheinungen im Sinne der *Overton*schen Lipoidtheorie. Er nimmt an, daß die Hauptwirkung der Saponine eine chemische sei, indem sie die Lecithine und Cholesterine der Plasmahaut angreifen, die Bindung dieser Stoffe mit Eiweiß aufheben und damit den kolloidalen Zustand der Plasmahaut im Sinne einer gesteigerten Permeabilität verändern.

An der Möglichkeit einer Veränderung der Permeabilität der Zelle unter Einwirkung von Saponinen ist wohl kaum mehr zu zweifeln. *Seifriz* (17) hat bei *Elodea* und *Munthiu* (15) bei *Elodea, Spirogyra* und *Allium* eine Erhöhung der Permeabilität durch Saponin erzielt. In den Versuchen von *Munthiu* zeigte sich besonders für Glycerin eine starke Steigerung der Durchlässigkeit bei *Elodea*- und *Spirogyra*-Zellen. Etwas fraglicher erscheint die Erhöhung der Permeabilität für Rohrzucker. Nun können aber, wie *Munthiu* ausführt, die an plasmolysierten Zellen gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf normale Zellen übertragen werden. Bei der Erhöhung der Plasmolyse-Permeabilität handelt es sich um die Wirkung auf eine mechanisch veränderte Plasmaoberfläche. Ob die Permeabilität der *normalen* Zelle in gleicher Weise und vor allem in gleichem Maße durch das Saponin beeinflußt wird, ist bis jetzt noch nicht erwiesen. *Munthiu* vertritt die Ansicht, daß die Saponinwirkung bei Plasmolyse in verstärktem Maße zum Ausdruck kommt. Wenn überhaupt eine Erhöhung der Normalpermeabilität durch das Saponin stattfindet, kann diese auf keinen Fall so weit gehen, „daß dem Saponin selbst der Eintritt in die Zellen ermöglicht wird, denn sonst könnten die Zellen wohl nicht so lange in der Saponinlösung ohne sichtliche Störung am Leben bleiben" (*Munthiu*, S. 468).

Die Ergebnisse unserer Versuche mit Handelssaponinen könnten nun ohne weiteres so erklärt werden, daß durch den Zusatz von Saponin eine Erhöhung der Permeabilität für Glucose, Maltose, und andere Kohlenhydrate und Glucoside bewirkt wird. Damit könnten diese Stoffe in die Zelle eintreten und dort zum Aufbau verwendet werden. Dies war auch so lange unsere Arbeitshypothese, bis die Versuche mit dem gereinigten Saponinpräparat von Prof. *Rosenthaler* ganz unerwartete Ergebnisse brachten. Diese Versuche zeigten, daß *Ustilago violacea* in reinem Saponin überhaupt nicht wächst, und daß auch bei Zugabe von Glucose oder Saccharose kein besseres Wachstum erzielt wird als mit diesen Stoffen allein, ohne Saponin. Das gute Wachstum bei Verwendung von Handelspräparaten muß also nicht auf eine Wirkung des Saponins selber, sondern auf eine Wirkung der Beimengungen oder der Verunreinigungen, die in allen Saponinpräparaten des Handels enthalten sind, zurückgeführt werden. Daß solche Stoffe auf das Wachstum des Pilzes einwirken können, zeigt sich auch in den Versuchen mit Inulin, Maltose und Glycerin und anderen Stoffen, von denen gesagt werden kann, daß sie auf das Wachstum von *Ustilago violacea* um so günstiger wirken, je unreiner sie sind.

Über die Beschaffenheit der wirksamen Stoffe sind wir vorläufig noch ganz im unklaren. Sicher ist aber, daß diese schon in sehr kleinen Mengen wirksam sind. Aus Tabelle IV geht hervor, daß in Anwesenheit von Glucose schon durch eine Saponinkonzentration von 0,5 ‰ ein gutes Wachstum ausgelöst wird, das einem nephelometrischen Wert von etwa 10 entspricht. Nun enthält eine solche Kultur wie früher ausgeführt wurde, 15 mg Saponin und in diesem etwa 0,045 mg Stickstoff (0,3 %). Auch wenn wir annehmen, daß diese Stickstoffmenge

vom Pilz verwertet werden kann, erscheint es doch nicht sehr wahrscheinlich, daß eine so kleine Stickstoffmenge ausreicht zur Bildung von etwa 14 mg Pilzsubstanz (Trockengewicht), die einem nephelometrischen Wert von 10,4 entspricht. Die Annahme, daß in den Handelspräparaten des Saponins bestimmte Wuchsstoffe vorhanden seien, erscheint deshalb wahrscheinlicher. Auch *Boas* und *Steude* neigen zur Ansicht, daß die Saponinpräparate „Wuchshormone" enthalten. Daß daneben in den Handelssaponinen jeder Herkunft auch noch beträchtliche Mengen von Stoffen (Stickstoffverbindungen und Mineralsalze) vorhanden sind, die für den Pilz als eigentliche Nährstoffe in Betracht kommen, geht daraus hervor, daß *Ustilago violacea* auch auf Saponinlösungen ohne jeden Zusatz ziemlich gut gedeiht.

Es wäre nun sehr interessant, die Versuche über den Einfluß des Saponins auf die Gärtätigkeit der Hefen mit reinen Saponinpräparaten zu wiederholen. Es müßte sich dann zeigen, ob die von *Boas* vertretene Ansicht, daß durch das Saponin eine Erhöhung der Permeabilität der Hefezelle und damit eine Steigerung des Stoffumsatzes bewirkt wird, aufrechterhalten werden kann. Es wäre nämlich auch denkbar, daß die gleichen im Saponin vorkommenden Begleitstoffe, die für *Ustilago* wachstumsfördernd wirken, auch auf die Vermehrung der Hefezellen und damit indirekt auf den Gärungsprozeß beschleunigend einwirken könnten. Bei dieser Annahme wären allerdings die von *Boas* beobachteten Giftwirkungen von Metallsalzen in Gegenwart von Saponin schwieriger zu deuten. Nach *Schwartz* und *Kretzdorn* (19) machen sich aber die von *Boas* beobachteten Schädigungen durch Saponin bei Anwesenheit einwertiger Ionen von Neutralsalzen erst geltend, wenn Gärung eintritt. Wenn es sich nur um eine Frage der Permeabilitat handeln würde, so wäre nicht gut verständlich, warum die Schädigungen ausbleiben, wenn keine Gärung eintritt.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß Saponin in vielen Fällen doch auch als Zellgift wirken kann.

So beobachteten *Schwartz* und *Kretzdorn* allerdings eine erhohte Garungsintensitat bei Gegenwart von Saponin, zeigten aber auch, daß Saponin eine deutliche Zellschädigung bewirkt, die um so großer ist, je höher die Zuckerkonzentration und damit der Garungsumsatz ist. Die Saponinschadigungen treten nur bei Zusatz von gärfahigen Zuckern auf. Gibt man einen nicht vergarbaren Zucker, z. B. Lactose, bei, so bleibt die Schadigung aus.

Combes (7) konnte in Wasserkulturen von Phanerogamen in vielen Fällen eine Schadigung der Wurzeln durch Saponinzusatz nachweisen, die sich auch in einer Verminderung des Trockengewichts ausdrückte. Diese Schädigung tritt indessen nicht ein, wenn das Saponin auf die Wurzeln der gleichen Pflanzenart einwirkt, aus der es gewonnen wurde (*Agrostemma*). In diesem Falle ist die Wirkung gleich null oder sogar leicht fördernd. Eine bedeutende wachstumsfordernde Wirkung durch Saponin konnte *Combes*

bei höheren Pflanzen nicht feststellen. Es ist bemerkenswert, daß *Combes* die Handelspräparate des Saponins vor Gebrauch durch dreimalige Behandlung mit heißem und kaltem Alkohol weitgehend reinigte, und es erscheint durchaus möglich, daß er damit die wachstumsfördernden Stoffe aus dem Saponin entfernte oder unwirksam machte.

Bei unsern Versuchen mit *Ustilago violacea* ergaben sich also keine Anhaltspunkte für eine Erhöhung der Permeabilität durch Zusatz von Saponin. Damit soll natürlich nicht behauptet werden, daß eine solche Wirkung bei anderen Objekten nicht bestehe. Die physikalische Wirkung der Saponine, die in ihrer Oberflächenaktivität begründet ist, wurde in diesen Versuchen nicht berücksichtigt. Der fördernde Einfluß, den die Handelssaponine auf die Entwicklung von *Ustilago violacea* ausüben, kann auf die Verunreinigungen der Saponine zurückgeführt werden. Welcher Art die wirksamen Substanzen sind, ob es sich um Nahrungsstoffe, um besondere Wuchsstoffe vitaminartiger Natur oder um katalytisch wirksame mineralische Substanzen handelt, soll durch weitere Untersuchungen festgestellt werden. Es besteht schließlich auch noch die Möglichkeit, daß die Verunreinigungen des Saponins einen entgiftenden Einfluß ausüben.

Zusammenfassung.

1. In einer einfachen Nährlösung zeigte der untersuchte Stamm von *Ustilago violacea f. Melandrii* nur mit Saponin als Kohlenstoffquelle einigermaßen befriedigendes Wachstum.

2. Steigende Saponinkonzentrationen bis zu 5 % üben keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum des Pilzes aus.

3. Kohlenstoffquellen wie Arabinose, Sorbit, Mannit, Lävulose, Glucose, Mannose, Saccharose, Maltose und Salicin, die für sich allein und auch in Kombinationen unter sich für den Pilz ungenügend sind, ergeben nach Zusatz von Saponin (Handelspräparate) ein sehr gutes Wachstum.

4. Fur eine enzymatische Spaltung des Saponins durch den Pilz bestehen keine Anhaltspunkte.

5. Ein weitgehend gereinigtes Saponinpräparat wirkte weder allein, noch in Verbindung mit Glucose und Saccharose günstig auf das Wachstum des Pilzes ein.

6. Die wachstumsfördernde Wirkung der im Handel erhältlichen Saponine beruht auf ihren Beimengungen oder Verunreinigungen, deren Natur vorläufig noch nicht bekannt ist. Eine eigentliche Saponinwirkung, die in einer Erhöhung der Permeabilität bestehen würde, konnte nicht festgestellt werden.

Nachträglicher Zusatz bei der Korrektur: Inzwischen hat sich bei weiterer Verfolgung der Frage herausgestellt, daß das Wachstum der *Ustilago violacea* von Aneurin abhängt. – Eine ausführliche Darstellung der neugewonnenen Ergebnisse wird im Archiv für Mikrobiologie demnächst erscheinen.

Literatur.

1) *Boas, F.*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **38**, 350, 1920. — 2) *Derselbe*, Biochem. Zeitschr. **117**, 166, 1921; **129**, 124, 1932. — 3) *Derselbe*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **40**, 249, 1922. — 4) *Derselbe*, ebenda **52**, 272, 1934. — 5) *Derselbe*, Dynamische Botanik. München, J. F. Lehmann, 1937. — 6) *Boas, F.*, u. *R. Steude*, Angew. Bot. **18**, 16, 1936. — 7) *Combes, R.*, Revue Gén. de Bot. **29**, **30**, 321, 1917/18. — 8) *Czapek*, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl., **3**, 525, 1921, Jena, G. Fischer. — 9) *Klebs, G.*, Jahrb. f. wiss. Bot. **32**, 1, 1898; **33**, 513, 1899. — 10) *Kluyver, A. J.*, Biochem. Zeitschr. **52**, 486, 1913. — 11) *Kofler*, Saponine in *Kleins* Handb. d. Pflanzenanalyse **3**, 2. Teil, 1095, 1932. — 12) *Martius, W.*, Beiträge zur Kenntnis von *Baccaris genistelloides* Pers. Diss. Basel 1933. — 13) *Medwedew, G.*, u. *A. Schelaumowa*, Biochem. Zeitschr. **289**, 52. 1936. — 14) *Milatz, J. N. W.*, u. *P. B. Rottier*, Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., **94**, 227, 1936. — 15) *Munthiu, O. B.*, Protoplasma **18**, 441, 1933. — 16) *Schopfer, W.-H.*, Ber. d. Schweiz. bot. Ges. **41**, 73, 1932. — 17) *Seifriz, W.*, Ann. of Bot. **37**, 489, 1923. — 18) *Ranker, E. R.*, Jour. Agr. Res. **41**, 435, 1930. — 19) *Schwartz, W.*, u. *H. Kretzdorn*, Biochem. Zeitschr. **280**, 72, 1935.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Agar-, Molybdän- und Eisenwirkung bei Azotobacter.

Eine Richtigstellung.

Von

August Rippel.

(Eingegangen am 30. November 1937.)

In einer Arbeit von *S. Krzemieniewski* und *J. Kovats* [Bull. Acad. Polon. Cl. Sc. Mathem. et Nat. Ser. B, Sc. nat. (I) 1936, S. 169, Krakau 1937] findet sich eine Bemerkung, die von meiner Seite eine Richtigstellung erfordert. Sie ist offenbar durch ein Mißverständnis meiner Darstellung entstanden. Die Verfasser sagen (S. 171): „Neuerdings kommt *Rippel* zu dem Schlusse, daß Molybdän von geringer Wirkung ist und der Nährlösung zugesetzte Agarmengen nicht ersetzen kann", und (S. 191) „daß er (*R.*) in Gegenwart von Molybdan keine bessere Wirkung als bei kleinen Agarmengen feststellen zu können glaubt". Tatsächlich aber handelt es sich um etwas ganz anderes, nämlich darum, ob der Zusatz von Agar durch im Agar vorhandenes Molybdän wirkt, was, wie gezeigt wurde, nicht der Fall ist (*A. Rippel*, diese Zeitschr. **7**, 210, 1936). Die Molybdänwirkung an sich stand gar nicht zur Diskussion. Sie wurde von mir nie geleugnet, wie auch aus einer zweiten Mitteilung von mir, die kurz nach der ersten erschien (*A. Rippel*, diese Zeitschr. **7**, 590, 1936) eindeutig hervorgeht (S. 595: „Die Tatsache der Molybdänwirkung ist uns heute . . . selbstverstandlich").

Bei dieser Gelegenheit möchte ich noch darauf hinweisen, daß meine an zweiter Stelle genannte Mitteilung die von den oben genannten Verfassern festgestellte optimale Eisenwirkung bei gleicher Konzentration ermittelt. Eine Wirkung auf die Stickstoffbindung, die Verfasser annehmen, ist indessen abzulehnen, da die Wirkung genau so in Nitrat-Nährlösung eintritt, und weil zudem bei anderen Bakterien das Eisenoptimum ebenfalls auf gleicher Höhe liegt.

Autorenverzeichnis.

Sachverzeichnis.

Vorbemerkung: Wegen der verschiedenen Handhabung der Bakterienbezeichnungen sind die Namen *Bacillus* und *Bacterium* (auch *Acetobacter* und *Pseudomonas*) unter einem Stichwort zusammengefaßt, wobei für die Artbezeichnung die Neutrumform gewählt ist (z. B. *B. prodigiosum* usw.). Eine wissenschaftliche Stellungnahme ist damit nicht zum Ausdruck gebracht.

Pflanzen-, Tier- und Personennamen sind *kursiv* gedruckt; neue Gattungs- und Artnamen sind durch **Fett**druck hervorgehoben. **Fett**druck der Seitenzahlen bedeutet, daß der Gegenstand ausführlicher behandelt ist.